



Universidad de Santiago de Compostela
Departamento de Microbiología y Parasitología

**COMPLEJOS PROTEICOS DE MEMBRANA EXTERNA
DE *Neisseria meningitidis*: ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y
CAPACIDAD ANTIGÉNICA**

Memoria presentada por **Juan Marzoa Fandiño**
para optar al Grado de Doctor en Biología

Santiago de Compostela, marzo de 2010

D. Carlos Ferreirós Domínguez, Profesor Titular de Microbiología de la Universidad de Santiago de Compostela, y **D.^a Sandra Sánchez Poza**, Profesora de Microbiología de la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMAN: Que la presente Tesis Doctoral, titulada “**Complejos proteicos de membrana externa de *Neisseria meningitidis*: análisis estructural y capacidad antigénica**”, que presenta D. Juan Marzoa Fandiño para optar al Grado de Doctor en Biología, ha sido realizada en esta Universidad y, hallándose concluida, autorizamos su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Santiago de Compostela, marzo de 2010

Prof. Carlos Ferreirós Domínguez

Prof.^a Sandra Sánchez Poza

La realización de esta Tesis Doctoral fue posible gracias a:

- Las subvenciones obtenidas del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FISS) (cód. P1050178).
- Las subvenciones obtenidas de la Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento. Xunta de Galicia (cód. PGIT 05PX11320302PR)
- La concesión de una beca de investigación de la Diputación de A Coruña.

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de esta Tesis Doctoral, y especialmente:

A los Profs. M.^a Teresa Criado Álvarez y Carlos Ferreirós Domínguez, por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y por su gran profesionalidad y calidad humana, de la que he aprendido y disfrutado estos años.

A la Prof.^a Sandra Sánchez Poza, codirectora de Tesis y amiga, por todos sus consejos y por tantas horas de laboratorio compartidas.

A los Dres. I. M. Feavers, E. Rosenqvist y D. R. Martin, por proporcionarnos las cepas bacterianas utilizadas para la realización de esta Tesis Doctoral, y a los Dres. A. C. Gorringe y C. Charlotte, del *Health Protection Agency* por su colaboración en la realización de los ensayos de citometría de flujo.

A Esteban Guitián (Servicio de Espectrometría de Masas de la Universidad de Santiago de Compostela) y a Félix Elortza (Servicio de Proteómica y Metabolómica de CIC bioGUNE, Bizkaia), por la identificación de proteínas y el asesoramiento técnico.

A mis compañeros de laboratorio Ana, Laura, Liliana, Paula, Luis, Ernesto, Rita, Miguel y Javier por su amistad y por darle ese toque de alegría al día a día.

A Cati por darme el amor y el aliento que tanto me ayudaron en los momentos de desánimo.

A mis padres y hermano, por su apoyo incondicional y por el cariño que siempre he recibido, sin el cual no habría podido llegar hasta aquí.

Relación de artículos publicados y en proceso de publicación como resultado del desarrollo de esta Tesis Doctoral:

Marzoa J, Sánchez S, Abel A, Criado MT, Ferreirós CM. Estudio comparativo de técnicas electroforéticas no desnaturalizantes para el análisis de complejos proteicos de membrana externa de *Neisseria meningitidis*. *Proteómica*. 2008; 1: 91-92.

Marzoa J, Abel A, Sánchez S, Chan H, Feavers I, Criado MT, Ferreirós CM. Analysis of outer membrane porin complexes of *Neisseria meningitidis* in wild-type and specific knock-out mutant strains. *Proteomics*. 2009; 9: 648-656.

Marzoa J, Sánchez S, Brookes C, Taylor S, Gorringer A, Criado MT. Chaperonin (MSP63) complexes induce bacteriacidal and opsonophagocytic cross-reactive antibodies. *Vacci Monitor*. 2009; 18: 87-89.

Marzoa J, Sánchez S, Ferreirós CM, Criado MT. Identification of *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicle complexes using 2-D high resolution clear native/SDS-PAGE. *J Proteome Res*. 2010; 9: 611-619.

Marzoa J, Sánchez S, Costoya L, Brookes C, Taylor S, Gorringer AR, Criado MT, Ferreirós CM. Induction of immune responses by major outer membrane native complexes from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* (En preparación).

Relación de artículos publicados en los que se incluyen datos obtenidos a raíz de la optimización de las técnicas empleadas en esta Tesis Doctoral:

Arenas J, Abel A, Sánchez S, Marzoa J, Berrón S, van der Ley P, Criado MT, Ferreirós CM. A cross-reactive neisserial antigen encoded by the NMB0035 locus shows high sequence conservation but variable surface accessibility. *J Med Microbiol*. 2008; 57: 80-87.

Abel AM, Sánchez S, Marzoa J, Criado MT, Ferreirós C. Estudio de la interacción de las porinas PorA y PorB de *Neisseria* por incorporación en liposomas y “Blue Native Electrophoresis”. *Proteómica*. 2008; 1: 76-77.

Sánchez S, Abel A, Marzoa J, Gorrige A, Criado T, Ferreirós CM. Characterisation and immune responses to meningococcal recombinant porin complexes incorporated into liposomes. *Vaccine*. 2009; 27: 5338-5343.

A mis padres

**Complejos proteicos de membrana externa de *Neisseria meningitidis*:
análisis estructural y capacidad antigénica**

	Página.
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
TABLA DE ABREVIATURAS.....	11
 INTRODUCCIÓN AL MENINGOCOCO Y LA ENFERMEDAD MENINGOCÓCICA	 13
1. <i>Neisseria meningitidis</i> , características generales.....	15
2. Epidemiología de la enfermedad meningocócica.....	18
3. Interacción con el huésped. Colonización, infección y respuesta inmune	21
3.1. Variabilidad antigénica como mecanismo de defensa	21
3.2. Colonización e invasión del huésped.....	22
3.3. Respuesta inmune frente al meningococo	25
3.3.1. Respuesta inmune humoral. Anticuerpos y sistema del complemento como principal mecanismo de defensa frente al meningococo.....	26
3.3.1.1. Regulación del sistema del complemento.....	30
3.3.1.2. Deficiencias en el sistema inmune relacionadas con el aumento de la susceptibilidad a la enfermedad meningocócica	31
3.3.1.3. Mecanismos de evasión de la acción del complemento.....	33
3.3.2. Respuesta inmune celular	35
4. Estrategias en el diseño de vacunas meningocócicas. Situación actual.....	39
5. Epitopos conformacionales. Importancia de su estudio.....	56
 OBJETIVOS E INTERÉS DEL TRABAJO	 59
 CAPÍTULO I: Análisis y caracterización de los complejos proteicos de membrana externa de <i>N. meningitidis</i>.....	 65
1. INTRODUCCIÓN	67
1.1. Proteínas de membrana externa de <i>N. meningitidis</i>	67
1.1.1. Proteínas de clase.....	68
1.1.2. Proteínas de captación de hierro	73

1.1.3. Otras proteínas	75
1.2. El estudio de los complejos proteicos de membrana	76
1.3. Técnicas para el análisis de complejos proteicos	79
1.3.1. Métodos electroforéticos no desnaturalizantes	79
1.3.2. Otros métodos utilizados en el estudio de interacciones proteína-proteína.....	86
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	91
2.1. Cepas bacterianas utilizadas y características.....	91
2.2. Conservación de las cepas	92
2.3. Condiciones de cultivo	93
2.4. Obtención de las vesículas de membrana externa (OMVs).....	93
2.4.1. Extracción de OMVs con Prensa de French	93
2.4.2. Extracción con deoxicolato sódico	94
2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	94
2.6. Electroforesis unidimensional <i>high resolution Clear Native Electrophoresis</i> (1-DhrCNE)	95
2.7. Electroforesis bidimensional nativa/desnaturalizante (2-D hrCNE/SDS-PAGE).....	97
2.8. Electroforesis bidimensional nativa/nativa (2-D hrCNE/hrCNE)	98
2.9. Análisis informático de las imágenes de geles	98
2.10. Identificación de proteínas	98
3. RESULTADOS.....	101
3.1. Análisis electroforético 1-D hrCNE	101
3.2. Análisis electroforético 2-D hrCNE/hrCNE.....	101
3.3. Identificación de proteínas por LC-MS/MS	105
3.4. Análisis electroforético 2-D hrCNE/SDS-PAGE y MALDI-TOF.....	107
3.5. Caracterización de complejos proteicos de las cepas mutantes PorA ⁻ , PorB ⁻ , RmpM ⁻ y FetA ⁻	117
3.6. Caracterización de complejos proteicos en cepas heterólogas	119
4. DISCUSIÓN	125
 CAPÍTULO II: Análisis de la respuesta inmune frente a vesículas de membrana externa y complejos proteicos de membrana externa purificados.....	 137
 1. INTRODUCCIÓN.....	 139

1.1. Indicadores de protección contra la enfermedad meningocócica.....	139
1.1.1. Actividad bactericida del suero	139
1.2. Otros mecanismos relacionados con la protección frente al meningococo B	142
1.2.1. Unión de anticuerpos a superficie (SLA).....	143
1.2.2. Deposición de Complemento (CDA)	143
1.2.3. Opsonofagocitosis	144
1.2.4. Actividad bactericida de la sangre total.....	146
1.2.5. ELISA de anticuerpos salivares.....	146
2. MATERIAL Y MÉTODOS	149
2.1. Cepas bacterianas, características y condiciones de cultivo	149
2.2. Obtención de antígenos para la inmunización de animales de experimentación	149
2.2.1. Purificación de los complejos proteicos de membrana externa	149
2.3. Obtención de sueros inmunes	151
2.3.1. Sueros anti-OMVs	151
2.3.2. Sueros anti-complejos.....	152
2.4. Caracterización de los sueros por Western-blotting.....	152
2.4.1. SDS-PAGE.....	152
2.4.2. hrCNE.....	152
2.4.3. Western-blotting	153
2.5. Ensayo de actividad bactericida.....	154
2.6. Ensayos de citometría de flujo.....	155
2.6.1. Ensayo de unión de anticuerpos a superficie.....	156
2.6.2. Ensayo de deposición de C3b.....	157
2.6.3. Ensayo de deposición de MAC	158
2.6.4. Ensayo de Opsonofagocitosis	159
2.7. Análisis de los datos.....	160
3. RESULTADOS	161
3.1. Purificación de los complejos proteicos	161
3.2. Obtención de sueros inmunes y caracterización por Western-blotting	164
3.3. Ensayo de actividad bactericida.....	167
3.4. Unión de anticuerpos a superficie	170
3.5. Deposición de complemento.....	173
3.6. Deposición de MAC	177
3.7. Opsonofagocitosis	180

DISCUSIÓN	183
CONCLUSIONES	199
BIBLIOGRAFÍA	203

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Distribución global de los principales serogrupos de <i>N. meningitidis</i> causantes de enfermedad.....	20
Figura 2 Prevalencia dependiente de edad de la enfermedad meningocócica en relación a la inmunidad poblacional calculada por la actividad bactericida del suero.....	27
Figura 3 Representación esquemática de las tres vías de activación del sistema del complemento.....	28
Figura 4 Línea temporal del desarrollo de vacunas meningocócicas.....	40
Figura 5 Modelos tridimensionales de la porina PorA y de un homotrímero de PorA.....	69
Figura 6 Esquema explicativo de la separación y análisis electroforético de complejos proteicos por electroforesis bidimensional nativa/desnaturalizante y nativa/nativa.....	85
Figura 7 Perfil electroforético de la 1-D hrCNE de OMVs de la cepa H44/76	102
Figura 8 Complejos proteicos de OMVs meningocócicas detectados por electroforesis 2-D hrCNE/hrCNE	103
Figura 9. Análisis electroforético 2-D hrCNE/SDS-PAGE de OMVs meningocócicas.....	108
Figura 10 Complejos proteicos de OMVs meningocócicas detectados por electroforesis 2-D hrCNE/SDS-PAGE con tampón de cátodo DDM	115
Figura 11 Complejos proteicos de OMVs meningocócicas detectados por electroforesis 2-D hrCNE/SDS-PAGE con tampón de cátodo TX100.....	116
Figura 12 Análisis electroforético 2-D hrCNE/SDS-PAGE de OMVs de cepas mutantes <i>knock-out</i>	118
Figura 13 Análisis electroforético 1-D hrCNE de OMVs de la cepa H44/76 y cinco cepas heterólogas.....	120
Figura 14 Análisis de los complexomas de cepas heterólogas mediante primera dimesión nativa, la segunda dimensión nativa y la segunda dimensión desnaturalizante	122
Figura 15 Comprobación de los complejos proteicos presentes en los eluidos mediante hrCNE. Comprobación de la composición proteica de los eluidos por SDS-PAGE	162
Figura 16 Caracterización por Western-blotting de los sueros de ratón.....	166
Figura 17 Unión total de anticuerpos de los sueros anti-OMVs y anti-complejos a la superficie bacteriana de la cepa homóloga H44/76.....	171

Figura 18	Unión total de anticuerpos de los sueros anti-OMVs y anti-complejos a la superficie bacteriana de la cepa homóloga H44/76 y el panel de cepas heterólogas.....	172
Figura 19	Deposición de complemento inducida por los sueros anti-OMVs y anti-complejos en la superficie bacteriana de la cepa homóloga H44/76	174
Figura 20	Deposición de complemento inducida por los sueros anti-OMVs y anti-complejos en la superficie bacteriana de la cepa homóloga H44/76 y el panel de cepas heterólogas.....	176
Figura 21	Deposición del complejo de ataque a membrana inducida por los sueros anti-OMVs y anti-complejo en la superficie bacteriana de la cepa homóloga H44/76.....	178
Figura 22	Deposición del complejo de ataque a membrana inducida por los sueros anti-OMVs y anti-complejos en la superficie bacteriana de la cepa homóloga H44/76 y el panel de cepas heterólogas.....	179
Figura 23	Opsonofagocitosis de la cepa homóloga H44/76 inducida por los sueros anti-OMVs y anti-complejos.	180
Figura 24	Opsonofagocitosis de la cepa homóloga H44/76 y el panel de cepas heterólogas inducida por los sueros anti-OMVs y anti-complejos.	182

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Vacunas antimeningocócicas disponibles en la actualidad frente a los serogrupos A, C, Y, y W135 de <i>N. meningitidis</i>	44
Tabla 2 Antígenos de membrana externe que están o han estado bajo estudio como candidatos vacunales frente al serogrupo B.....	46
Tabla 3 Eficacia de las vacunas basadas en vesículas de membrana externa de serogrupo B de <i>N. meningitidis</i>	49
Tabla 4 Vacunas disponibles o en desarrollo contra el serogrupo B.....	52
Tabla 5 Relación de cepas utilizadas en este trabajo.	92
Tabla 6 Identificación por LC/MS-MS de los componentes de los principales complejos proteicos detectados por electroforesis diagonal hrCNE/hrCNE.....	106
Tabla 7 Identificación por MALDI-TOF de los principales puntos detectados mediante electroforesis bidimensional hrCNE/SDS-PAGE.....	111
Tabla 8 Identificación por MALDI-TOF de los puntos detectados utilizando electroforesis bidimensional hrCNE/SDS-PAGE que no están descritos como proteínas asociadas a la membrana externa.....	113
Tabla 9 Listado de sueros inmunes obtenidos por inmunización de ratones y antígenos utilizados para dicha inmunización.	164
Tabla 10 Titulación de la actividad bactericida de los sueros de ratón anti-OMVs.....	169
Tabla 11 Titulación de la actividad bactericida de los sueros de ratón anti-complejos...	169

TABLA DE ABREVIATURAS

1-D	Primera dimensión
2-D	Segunda dimensión
BCA	Ácido bicinconínico (<i>Bicinchoninic acid</i>)
BCECF	biscarboxietilcarboxi-fluoresceína
BCR	Receptor de células B (<i>B Cell Receptor</i>)
BNE	<i>Blue Native Electrophoresis</i>
BRET	Bioluminiscencia por transferencia de energía resonante (<i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i>)
BSA	Seroalbúmina bovina
C'	Fuente de complemento
CBA	Ensayo de Deposición de Complemento (<i>Complement Deposition Assay</i>)
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
cc	Complejo clonal
CFU	Unidad formadora de colonia
Chap	Chaperonina de 60 kDa
CNE	<i>Clear Native Electrophoresis</i>
Cx	Complejo proteico
DDM	n-dodecil- β -D-maltósido
DOC	Ácido deoxicolato sódico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ET	Tipo electroforético (<i>Electrophoresis Type</i>)
fH	Factor H
fHbp	Proteína de unión al factor H (<i>Factor H Binding Protein</i>)
FI	Índice de fluorescencia
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato (<i>Fluorescein isothiocyanate</i>)
FRET	Fluorescencia por transferencia de energía resonante (<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>)
GBSS	Solución gelatin-salina de equilibrado (<i>Gelatin Balanced Salt Solution</i>)
Glu	Glutamina sintetasa
GNA	Antígeno de <i>Neisseria</i> derivado de genoma (<i>Genome-derived neisserial antigen</i>)
hrCNE	<i>high resolution Clear Native Electrophoresis</i>
ID	Código de identificación

IEF	Isoelectroenfoque
IPP	Interacción proteína-proteína
Ket	Cetol-ácido reductoisomerasa
LOS	Lipooligosacáridos
LPS	Lipopolisacárido
MAC	Complejo de ataque a membrana (<i>Membrane Attack Complex</i>)
MBL	Lectina de unión a manosa (<i>Manose Binding Lectin</i>)
mbSUS	<i>Mating-Based Split-Ubiquitin System</i>
MCH	Complejo mayor de histocompatibilidad (<i>Mayor Complex Histocompatibly</i>)
MIP	Potenciador de la infectividad a macrófagos (<i>Macrophage Infectivity Potenciator</i>)
MLEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Tiping</i>
OPA	Ensayo de opsonofagocitosis (<i>Opsonophagocytosis Assay</i>)
NOMV	Vesícula de membrana externa nativa (<i>Native Outer Membrane Vesicle</i>)
OMV	Vesícula de membrana externa (<i>Outer Membrane Vesicle</i>)
ORF	Marco abierto de lectura (<i>Origyn Reading Frame</i>)
PA	Poliacrilamida
PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
PBS	Tampón fosfato salino
PS	Polisacárido
PVDF	Polivinilidenofluoruro (<i>Polyvinylidene fluoride</i>)
SBA	Ensayo de actividad bactericida del suero (<i>Serium Bactericidal Assay</i>)
SDS	dodecilsulfato de sodio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SLA	Ensayo de unión a superficie (<i>Surface Labeling Assay</i>)
SPR	Resonancia de plasmón superficial (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)
ST	tipos de secuencia (<i>Sequence Type</i>)
TAP-Tag	<i>Tandem Afinity Purification-Tag</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
TX100	Triton X-100
Y2H	Sistema de doble híbrido (<i>Yeast Two Hibrid</i>)

**INTRODUCCIÓN AL MENINGOCOCO Y LA ENFERMEDAD
MENINGOCÓCICA**

1. *Neisseria meningitidis*, características generales

Neisseria meningitidis es una bacteria Gram-negativa, oxidasa positiva, productora de catalasa, y que se asocia en parejas formando diplococos. Como la mayoría de las especies pertenecientes al género *Neisseria*, posee respiración aeróbica y su crecimiento se ve estimulado por una atmósfera húmeda con una concentración de dióxido de carbono entre el 5% y el 10%, una temperatura de 35 a 37 °C y un pH entre 7,4 y 7,6. *N. meningitidis* coloniza la nasofaringe humana, su único reservorio conocido, manteniendo con el huésped una relación de comensalismo obligado. La mayoría de la personas presentarán esta bacteria de manera asintomática a lo largo de su vida, estado conocido como portador. El meningococo sobrevive de manera muy breve expuesto al ambiente, por lo que la transmisión entre individuos requiere vehículos como las secreciones respiratorias superiores y en contactos cercanos con portadores, normalmente asintomáticos. Ocasionalmente, las bacterias pueden penetrar las membranas de las mucosas y acceder al sistema sanguíneo, como resultado de la coincidencia de determinadas características de cepa o susceptibilidad del huésped. La bacteria tras sobrevivir y multiplicarse en el sistema sanguíneo (bacteremia), puede atravesar las meninges y acceder al fluido cerebroespinal, provocando meningitis debido a la fuerte inflamación inducida por los factores de virulencia. Los síndromes clínicos son varios e incluyen meningitis, con o sin meningococemia, meningococemia fulminante, meningoencefalitis, neumonía, artritis séptica y otras presentaciones. El número de casos mortales ronda el 12%, siendo la meningococemia sin meningitis el síndrome más mortal. Las secuelas permanentes son comunes entre los supervivientes de infección meningocócica.

N. meningitidis puede encontrarse envuelta por una cápsula polisacáridica, anclada a su membrana externa, que permite diferenciar, al menos, trece grupos serológicamente distinguibles (A, B, C, H, I, K, L, M, X, Y, Z, 29E y W135).

Prácticamente todas las cepas aisladas de pacientes son capsuladas, y sólo seis serogrupos (A, B, C, W135, Y y, más recientemente, X¹) han demostrado tener un potencial patogénico significativo. El meningococo se clasifica además en tipos, subtipos e inmunotipos en base a la reactividad inmunológica de sus proteínas mayoritarias de membrana externa PorB y PorA, y de los lipooligosacáridos respectivamente^{2,3}. La nomenclatura aceptada para el serotipado describe el grupo, tipo, subtipo (con prefijo P1.) e inmunotipo (con prefijo L) separados por dos puntos (Ej. B:4:P1.4:L3,7,9). Los subtipos están determinados por epitopos presentes en dos regiones variables (VR1 y VR2) de la PorA⁴. A su vez, los subtipos PorA se dividen en variantes no clasificables fenotípicamente definidas por las secuencias nucleotídicas codificantes para las regiones VR. Se han descrito 10 familias de VR1 con un total de 124 variantes y 17 familias de VR2 con 344 variantes⁵. Actualmente también se utilizan otras proteínas de membrana externa para el tipado, como el receptor enterobactina FetA⁶ o la proteína fHbp⁷.

A medida que ha ido creciendo el conocimiento sobre las características biológicas y epidemiológicas de *N. meningitidis*, la caracterización serológica de las cepas en base a productos de *loci* únicos empezó a mostrar limitaciones, como son una cobertura incompleta, las dificultades en la producción de reactivos, la falta de expresión de antígenos diana por determinadas cepas, los altos niveles de selección positiva experimentada por componentes meningococales de superficie

¹ Boisier P, Nicolas P, Djibo S, Taha MK, Jeanne I *et al.* Meningococcal meningitis: unprecedented incidence of serogroup X-related cases in 2006 in Niger. *Clin Infect Dis.* 2007; 44: 657-663.

² Frasch CE, Zollinger WD, Poolman JT. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev Infect Dis.* 1985; 7: 504-510.

³ Scholten RJ, Kuipers B, Valkenburg HA, Dankert J, Zollinger WD *et al.* Lipo-oligosaccharide immunotyping of *Neisseria meningitidis* by a whole-cell ELISA with monoclonal antibodies. *J Med Microbiol.* 1994; 41: 236-243.

⁴ Tzitzilonis C, Prince SM, Collins RF, Achtman M, Feavers IM *et al.* Structural variation and immune recognition of the P1.2 subtype meningococcal antigen. *Proteins.* 2006; 62: 947-955.

⁵ <<http://neisseria.org/perl/agdbnet/agdbnet.pl?file=poravr.xml>>

⁶ <<http://neisseria.org/perl/agdbnet/agdbnet.pl?file=fetavr.xml>>

⁷ <http://neisseria.org/perl/agdbnet/agdbnet.pl?file=nm_fhbp.xml>

o la escasa capacidad para establecer relaciones genéticas subyacentes entre distintos aislados, debido principalmente al intercambio horizontal de genes codificantes para productos utilizados en el tipado⁸ y. Por ello, en los últimos años se han desarrollado técnicas más resolutivas y adecuadas para el conocimiento de la estructura y dinamismo de las poblaciones de meningococo, permitiendo una vigilancia global y un correcto desarrollo y evaluación de nuevas vacunas. La secuenciación completa de cinco cepas de *N. meningitidis* (entre ellas: Z2491 del serogrupo A⁹, MC58 del serogrupo B¹⁰ y FAM18 del serogrupo C^{11,12}) y la mejora de las técnicas moleculares, han permitido el desarrollo de protocolos de tipado molecular que superan muchos de los problemas antes mencionados. La técnica *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE), desarrollada a principios de los años 80, ha sido aplicada a *N. meningitidis* mostrando ser una potente herramienta para distinguir numerosos genotipos y conocer la estructura de las distintas poblaciones y la epidemiología molecular global de esta especie. De este modo se agrupan los distintos linajes en tipos electroforéticos (ETs), definidos por un perfil alélico de distintos enzimas citoplasmáticos esenciales⁷. La técnica *Multilocus Sequence Typing* (MLST), desarrollada a finales de los 90, posee un mayor grado de definición al trabajar directamente con la secuencia de nucleótidos de varios *loci*, clasificando las cepas en “tipos de secuencia” (STs)⁷. Los tipos de secuencia se agrupan en complejos clonales por similitud a un genotipo “central”, identificado a partir de datos epidemiológicos de laboratorios de salud pública. Gracias a esta tecnología

⁸ **Caugant DA.** Genetics and evolution of *Neisseria meningitidis*: importance for the epidemiology of meningococcal disease. *Infect Genet Evol.* 2008; 8: 558-565.

⁹ **Parkhill J, Achtman M, James KD, Bentley SD, Churcher C et al.** Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491. *Nature.* 2000; 404: 502-506.

¹⁰ **Tettelin H, Saunders NJ, Heidelberg J, Jeffries AC, Nelson KE et al.** Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science.* 2000; 287: 1809-1815.

¹¹ **Bentley SD, Vernikos GS, Snyder LA, Churcher C, Arrowsmith C et al.** Meningococcal genetic variation mechanisms viewed through comparative analysis of serogroup C strain FAM18. *PLoS Genet.* 2007; 3: e23.

¹² **Schoen C, Blom J, Claus H, Schramm-Glück A, Brandt P et al.** Whole-genome comparison of disease and carriage strains provides insights into virulence evolution in *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 3473-3478.

se ha podido observar que, a pesar de la gran variabilidad de las poblaciones de *N. meningitidis*, unos pocos complejos clonales están relacionados con los episodios epidemiológicos y endémicos en las distintas regiones del globo. Recientemente se ha sugerido que se adopte una nomenclatura modificada que incluye serogrupos, tipo PorA, tipo FetA, secuencia tipo y complejo clonal (cc)¹³; como ejemplo: B: P1.19,15: F5-1: ST-33 (cc32).

2. Epidemiología de la enfermedad meningocócica

Los cinco principales serogrupos causantes de enfermedad presentan distinta distribución mundial y comportamiento epidemiológico (**figura 1**). El serogrupo A causa epidemias cada 8 o 10 años, con una duración de 3 a 4 años, que esencialmente se focaliza en el África subsahariana (en el denominado “cinturón de la meningitis”) durante la estación seca, con tasas de incidencia cercanas incluso al 1% y de letalidad en torno al 10 o 15%¹⁴. Sin embargo, en Europa y Estados Unidos este serogrupo apenas es responsable del 0.3% de los casos de enfermedad meningocócica, aunque con notables excepciones como los brotes surgidos en EEUU¹⁵ y Finlandia¹⁶ en los años 70, y más recientemente Moscú¹⁷, donde los aislados del serogrupo A alcanzaron el 10% de los casos. Los análisis genotípicos de los aislados del serogrupo A indican que los brotes epidémicos de enfermedad de este serogrupo son causados principalmente por linajes clonales

¹³ **Jolley KA, Brehony C, Maiden MC.** Molecular typing of meningococci: recommendations for target choice and nomenclature. *FEMS Microbiol Rev.* 2007; 31: 89-96.

¹⁴ **Harrison LH.** Prospects for vaccine prevention of meningococcal infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19: 142-164.

¹⁵ **Counts GW, Gregory DF, Spearman JG, Lee BA, Filice GA et al.** Group A meningococcal disease in U.S. Pacific Northwest: epidemiology, clinical features and effect of a vaccination control program. *Rev Infect Dis.* 1984; 6: 640-648.

¹⁶ **Peltola H, Mäkelä PH, ELO O, Pettay O, Renkonen OV et al.** Vaccination against meningococcal group A disease in Finland 1974-75. *Scand J Infect Dis.* 1976; 8: 169-174.

¹⁷ **Achtman M, van der Ende A, Zhu P, Koroleva IS, Kusecek B et al.** Molecular epidemiology of serogroup a meningitis in Moscow, 1969 to 1977. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7: 420-427.

específicos, como el complejo ST-5, responsable de dos pandemias acaecidas en la segunda mitad del siglo XX¹⁸.

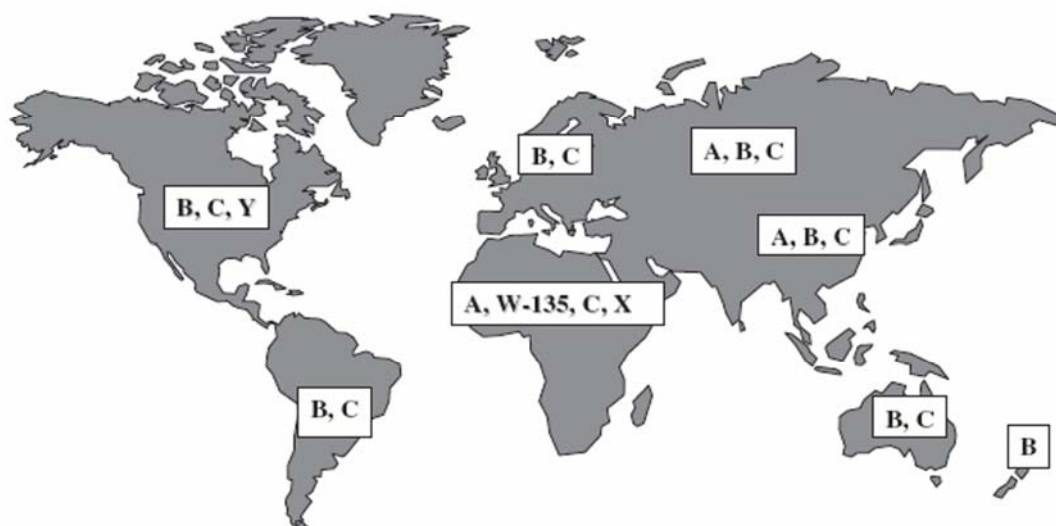
El serogrupo B es el principal responsable de enfermedad meningocócica endémica en países desarrollados, representando hasta el 90% de los casos esporádicos en varios países europeos, y cerca del 50% en EEUU. En comparación con las del serogrupo A, las epidemias del serogrupo B se producen de manera más lenta, asociadas a bajas proporciones de enfermedad, pudiendo durar 10 años o más y están asociadas a la emergencia de cepas hipervirulentas¹⁹. En la década de los 70, se produjeron importantes incrementos en la incidencia de la enfermedad en Noruega y España debido a cepas del serogrupo B del complejo clonal ET-5/ST-32¹⁹. Este mismo complejo clonal causó un severo brote epidémico en Cuba en los años 80, propagándose a la región de São Paulo, en Brasil, a finales de los años 80. Nueva Zelanda experimentó una epidemia desde 1991 hasta 2007²⁰, causada por el complejo ST41/44.

¹⁸ **Olyhoek T, Crowe BA, Achtman M.** Clonal population structure of *Neisseria meningitidis* serogroup A isolated from epidemics and pandemics between 1915 and 1983. *Rev Infect Dis.* 1987; 9: 665-692.

¹⁹ **Caugant DA, Frøholm LO, Bøvre K, Holten E, Frasch CE et al.** Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83: 4927-4931.

²⁰ **Baker MG, Martin DR, Kieft CE, Lennon D.** A 10-year serogroup B meningococcal disease epidemic in New Zealand: descriptive epidemiology, 1991-2000. *J Paediatr Child Health.* 2001; 37: 13-19.

Figura 1. Distribución global de los principales serogrupos de *N. meningitidis* causantes de enfermedad (tomada de Stephens DS, 2007).



El porcentaje de aislamientos del grupo C responsable de enfermedad meningocócica endémica varía en función del país. Hasta la introducción de la vacuna conjugada contra este serogrupo, fue uno de los máximos responsables de la enfermedad endémica en Europa y Norteamérica, alcanzando proporciones de hasta el 40% y registrándose múltiples epidemias²¹. La mayoría de estas infecciones son causadas por cepas altamente relacionadas pertenecientes al complejo clonal ST11/ET37¹⁴.

Hasta hace poco tiempo, el serogrupo W135 era relativamente raro como causante de enfermedad invasiva y tampoco producía brotes epidémicos. Sin embargo, en 2001 produjo un brote epidémico en Arabia Saudí durante el

²¹ **Granoff DM, Harrison LH, Borrow R.** Meningococcal vaccines. En : Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA (Eds). *Vaccines*. Reino Unido: Elsevier Inc; 2008. p. 399-432.

peregrinaje de miles de personas del cinturón subsahariano a La Meca²². El clon causante pertenece al complejo clonal ST11/ET37, al que también pertenecen las cepas virulentas del serogrupo C comentadas en el párrafo anterior. Algunos autores sugieren que la coexistencia de dos serogrupos en el mismo complejo clonal es debido al llamado *capsular switching*, mecanismo por el que el meningococo cambia de serogrupo a través de la transformación y recombinación de los genes implicados en la síntesis de la cápsula, incrementando así su variabilidad^{23, 24}.

3. Interacción con el huésped. Colonización, infección y respuesta inmune

3.1. Variabilidad antigénica como mecanismo de defensa

Uno de los rasgos más relevantes de *N. meningitidis* es su gran variabilidad antigénica, tanto en los niveles de expresión de factores de virulencia, como de las propiedades antigénicas de los mismos. La diversidad antigénica favorece la evasión a la respuesta inmune por lo que supone un importante obstáculo en el desarrollo de vacunas²⁵. Los mecanismos utilizados por el meningococo para generar la alta variabilidad antigénica que lo caracteriza son varios, como la variación de fase, el *capsular switching* o la transformación y recombinación homóloga. La variación de fase consiste en la expresión/no expresión de características fenotípicas, como proteínas, modificaciones secundarias,

²² Taha MK, Achtman M, Alonso JM, Greenwood B, Ramsay M *et al.* Serogroup W135 meningococcal disease in Hajj pilgrims. *Lancet*. 2000; 356: 2159.

²³ Swatley JS, Marfin AA, Edupugantu S, Liu LJ, Cieslak P *et al.* Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 271-276.

²⁴ Alcalá B, Arreaza L, Salcedo C, Uría MJ, De La Fuente L *et al.* Capsule Switching among C:2b:P1.2,5 meningococcal epidemic strain alter mass immunization campaign, Spain. *Emerging Infectious Diseases*. 2002; 8: 1512-1514.

²⁵ Billker O, Gödert S, Meyer TF. Interactions of *Neisseria meningitidis* with the immune system. En: Ferreirós CM, Criado MT, Vázquez J. (Eds.) *Emerging Strategies In The Fight Against Meningitis: Molecular and Cellular Aspects*. 2002; Reino Unido: Horizon Scientific Press.

estructuras antigénicas, y que comúnmente se encuentra regulado por mutaciones en repeticiones en tándem de secuencias únicas de ADN localizadas en *Open Reading Frames* (ORFs) o en regiones promotoras de genes codificantes para factores de virulencia²⁶. El *capsular switching* es un mecanismo de variabilidad antigénica por el que una determinada cepa sufre un cambio de serogrupo a través de la transformación y subsiguiente recombinación del gen que codifica para la polysialyltransferasa (*siaD*) o del operón de la biosíntesis de la cápsula. Este mecanismo de intercambio genético también es común en los *loci* de los genes que codifican para las proteínas de membrana externa PorA y PorB, en los que puede ocurrir la sustitución de cada alelo completo o el intercambio de una o varias regiones variables²⁷. Otros mecanismos implicados son la recombinación homóloga intra-bacteria en grandes familias de genes, que generan variación en la secuencia de genes determinados, y los elementos genéticos transponibles que interrumpen la expresión de manera reversible.

3.2. Colonización e invasión del huésped

Muchos patógenos han evolucionado para colonizar y completar su ciclo vital sin causar enfermedad, resultando la enfermedad infecciosa, como en el caso del meningococo, un suceso ocasional. Conocer los mecanismos que el patógeno utiliza en la colonización es de vital importancia para el desarrollo de estrategias en la prevención del estado de portador y la erradicación de la enfermedad. Sin embargo, estos mecanismos son de difícil estudio debido a la frecuente especificidad del patógeno por receptores y nutrientes del huésped²⁸.

²⁶ Srikhanta YN, Dowideit SJ, Edwards JL, Falsetta ML, Wu HJ *et al.* Phasevarions mediate random switching of gene expression in pathogenic *Neisseria*. *PLoS Pathog.* 2009; 5: e1000400.

²⁷ Beddek AJ, Li MS, Kroll JS, Jordan TW, Martin DR. Evidence for capsule switching between carried and disease-causing *Neisseria meningitidis* strains. *Infect Immun.* 2009; 77: 2989-2994.

²⁸ Exley RM, Sim R, Goodwin L, Winterbotham M, Schneider MC *et al.* Identification of meningococcal genes necessary for colonization of human upper airway tissue. *Infect Immun.* 2009; 77: 45-51.

El primer paso en la patogénesis de la mayoría de las enfermedades infecciosas es la colonización de individuos susceptibles por parte del microorganismo infeccioso. Dado que *N. meningitidis* interactúa con diferentes tipos celulares en el proceso de colonización, entrada en la circulación sistémica y producción de la enfermedad, presenta numerosas adhesinas que interaccionan con distintos receptores humanos, siendo los Pili tipo IV y las proteínas de membrana externa Opa y Opc, con diferencia, las expresadas más abundantemente²⁹.

En un primer contacto, el meningococo se une específicamente a las células epiteliales columnares no ciliadas de la nasofaringe e induce la producción de pseudopodios para su internalización en dichas células³⁰. El contacto inicial de la bacteria con las células epiteliales es mediado por los Pili tipo IV³¹, proyecciones filamentosas de 4-6 nm de ancho y unos 6 µm de largo que se extienden desde la superficie de la bacteria atravesando la cápsula polisacáridica. El receptor propuesto para los Pili tipo IV de *N. meningitidis* es la proteína CD46³², perteneciente a una familia de proteínas expresadas en prácticamente todos los tipos celulares con excepción de los eritrocitos. Tras este contacto inicial, el microorganismo prolifera en la superficie de las células epiteliales no ciliadas formando microcolonias en el lugar del contacto inicial.

La presencia de la cápsula impide la unión estrecha de otras adhesinas; sin embargo, el anclaje a las células epiteliales puede activar un sistema regulador

²⁹ **Virji M.** Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7: 274-286.

³⁰ **Stephens DS, Hofman LH, McGee ZA.** Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J Infect Dis.* 1983; 148: 369-376.

³¹ **Taha MK, Morand PC, Pereira Y, Eugène E, Giorgini D et al.** Pilus-mediated adhesion of *Neisseria meningitidis*: the essential role of cell contact-dependent transcriptional upregulation of the PilC1 protein. *Mol Microbiol.* 1998; 28: 1153-1163.

³² **Källström H, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB.** Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol.* 1997; 25: 639-647.

que conduce a la pérdida o a una menor expresión de la cápsula³³. Una vez desprovista de cápsula, se posibilita una adherencia íntima del meningococo a las células epiteliales, provocando la formación de placas corticales y conduciendo al reclutamiento de factores responsables de la formación y extensión de pseudopodios por parte de las células epiteliales que internalizarán al meningococo³⁴. Esta adhesión íntima es mediada por las proteínas de membrana externa Opa y Opc³⁵. Las proteínas Opa son una familia de proteínas transmembrana con estructura barril beta que presentan gran variabilidad antigénica y de expresión. A pesar de su alta heterogeneidad de expresión y variabilidad antigénica, distintas Opa pueden unirse al sitio común del receptor CD66 o CEACAM (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule*) humano, uno de sus principales receptores diana, expresado en prácticamente todos los tipos celulares humanos salvo en los eritrocitos. Las proteínas Opc comparten propiedades fisicoquímicas y una cierta homología con las proteínas Opa, aunque difieren en estructura y control genético. Las Opc se unen a la superficie apical de células epiteliales polarizadas, requiriendo como intermediarios factores del suero (integrinas), facilitando de este modo la internalización en las células. Recientemente han sido descritas otras moléculas implicadas en la adhesión e invasión del epitelio respiratorio, como la NhhA (*Neisseria/hsf homologue*), la App (*adhesion and penetration protein*), la HrpA (*haemagglutinin/haemolysin-related protein A*), NadA (*Neisseria meningitidis Adhesin A*) y MspA (*meningococcal serine protease A*)³⁶.

³³ **Hammerschmidt S, Müller A, Sillmann H, Mühlenhoff M, Borrow R et al.** Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol.* 1996; 20: 1211-1220

³⁴ **Dolet N, Donnadieu E, Laran-Chich MP, Niedergang F, Nassif X et al.** *Neisseria meningitidis* infection of human endothelial cells interferes with leukocyte transmigration by preventing the formation of endothelial docking structures. *J Cell Biol.* 2006. 173: 627-637.

³⁵ **Corbett A, Exley R, Bourdoulous S, Tang CM.** Interactions between *Neisseria meningitidis* and human cells that promote colonisation and disease. *Expert Rev Mol Med.* 2004; 6: 1-14.

³⁶ **Carbonnelle E, Hill DJ, Morand P, Griffiths NJ, Bourdoulous S et al.** Meningococcal interactions with the host. *Vaccine.* 2009; 27: 78-89.

Los siguientes pasos de internalización, transcitosis, supervivencia intracelular y diseminación en el torrente sanguíneo están menos estudiados³⁷. La bacteria atraviesa el espacio intracelular en el interior de vacuolas membranosas con la ayuda de factores de virulencia como la proteasa IgA₁, la cual degrada proteínas de membrana asociadas al lisosoma (LAMPs) previniendo la maduración del mismo, y activando la expresión de la cápsula. Una vez atravesada la mucosa, accede al torrente sanguíneo pudiendo, en algunos casos, multiplicarse rápidamente produciendo infección sistémica o translocarse a través de la barrera hemato-meningea y proliferar en el sistema nervioso central causando meningitis.

3.3. Respuesta inmune frente al meningococo

La respuesta del sistema inmune frente a la enfermedad causada por *N. meningitidis* involucra mecanismos, tanto innatos como adquiridos, que reconocen estructuras de la superficie bacteriana. Los escenarios donde tiene lugar son múltiples, comenzando en la mucosa nasofaríngea, y continuando en el sistema vascular y órganos infectados a medida que la infección avanza. La respuesta inmune varía en función de la edad del paciente así como del serogrupo del microorganismo, aunque los motivos moleculares todavía están por esclarecer. Los patrones mostrados por la enfermedad en individuos inmunodeficientes han arrojado claridad sobre la complejidad de la respuesta frente al meningococo y señalan a los anticuerpos y el sistema de complemento como los principales responsables de la respuesta, aunque la inmunidad celular está cobrando una mayor relevancia, especialmente en la respuesta contra el serogrupo B³⁸.

³⁷ **Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P.** Epidemic meningitis, meningococemia and *Neisseria meningitidis*. *Lancet*. 2007; 369: 2196-2210.

³⁸ **Findlow J, Taylor S, Aase A, Horton R, Heyderman R et al.** Comparison and correlation of *Neisseria meningitidis* serogroup B immunologic assay results and human antibody responses

3.3.1. Respuesta inmune humoral. Anticuerpos y sistema del complemento como principal mecanismo de defensa frente al meningococo

El papel central de los anticuerpos en la protección frente al meningococo se ve reflejado en relación inversa entre los títulos de anticuerpos anti-meningococales (o la actividad bactericida del suero) y la incidencia de la enfermedad en función de la edad del paciente³⁹ (**figura 2**). El 50% de los recién nacidos presentan actividad bactericida del suero como resultado de la transferencia de inmunoglobulinas protectoras maternas a través de la placenta. Esta inmunidad cae rápidamente tras el parto hasta los 12 meses de edad (cuando la susceptibilidad a la enfermedad es la más alta), período en el que sólo el 20% presentan actividad bactericida. Esta inmunidad se incrementa progresivamente durante la infancia hasta llegar a la edad adulta en la que el 65-85% de los individuos presentan suero bactericida contra el meningococo.

El sistema efector de la actividad bactericida del suero es el sistema del complemento, el cual juega un importantísimo papel en la defensa contra el meningococo. El sistema del complemento se compone de un grupo de proteínas, muchas de ellas con actividad enzimática, que interaccionan secuencialmente entre sí con un orden predefinido. Desempeñan un importante efecto tanto en la inmunidad innata como en la adquirida, ya que la activación de la cascada enzimática depende tanto de la unión de un anticuerpo a la superficie de la bacteria como por mecanismos de inmunidad innata.

following three doses of the Norwegian meningococcal outer membrane vesicle vaccine MenBvac. *Infect Immun.* 2006; 74: 4557-4565.

³⁹ Pollard AJ, Frasch C. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. *Vaccine.* 2001; 19: 1327-1346.

Figura 2. Prevalencia dependiente de edad de la enfermedad meningocócica en relación a la inmunidad poblacional calculada por la actividad bactericida del suero (tomada y modificada de Pollard AJ, 2001).

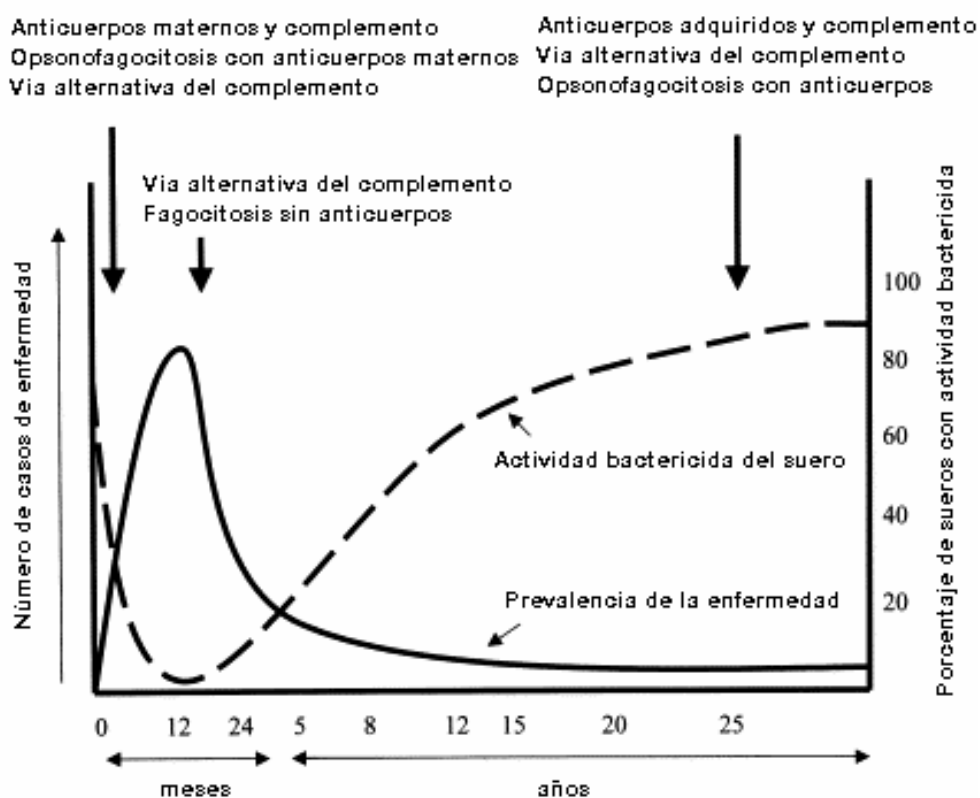
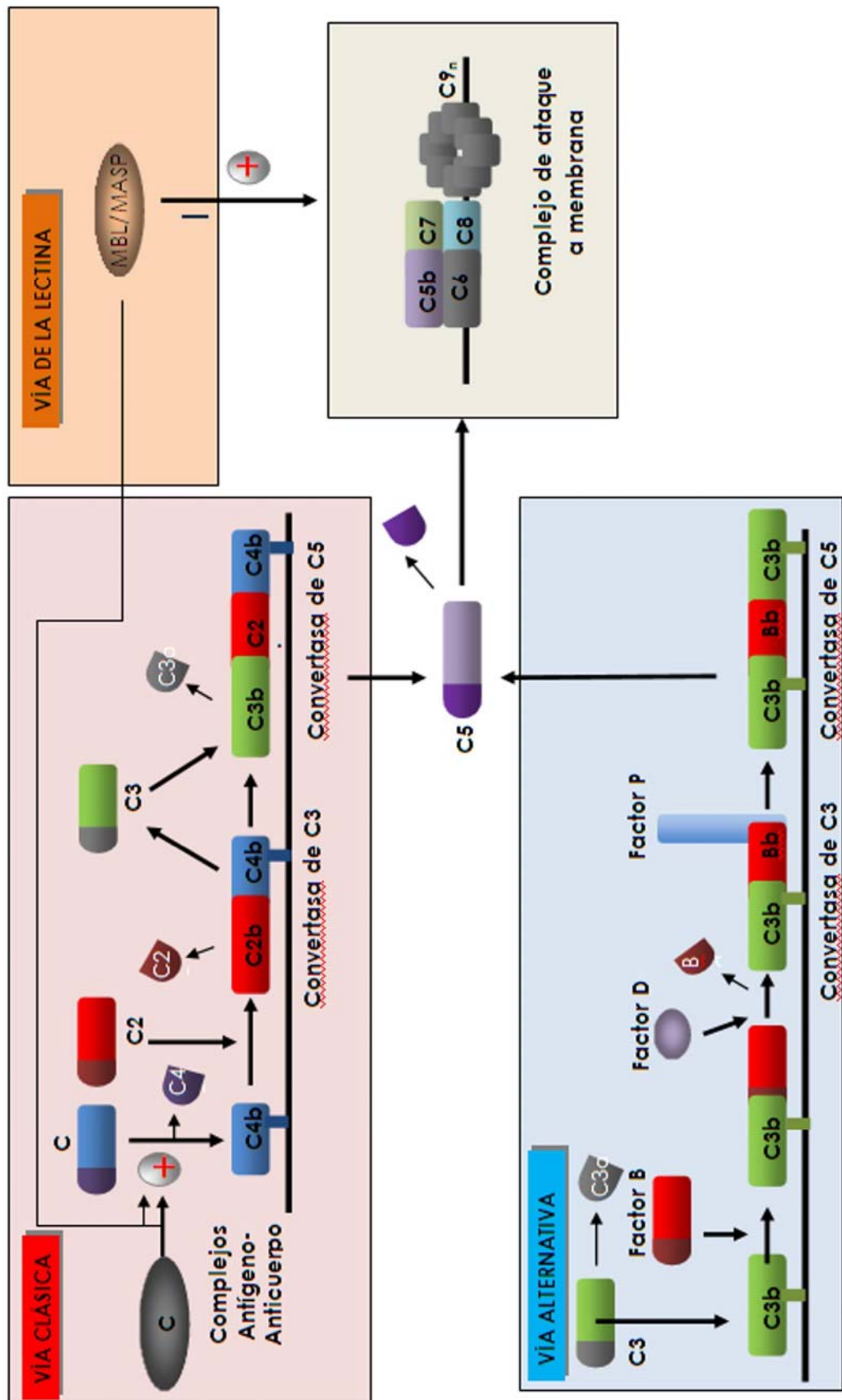


Figura 3. Representación esquemática de las tres vías de activación del sistema del complemento. Las tres vías confluyen en la formación de la convertasa de C5, desencadenando la formación del complejo de ataque a membrana y la lisis celular.



Existen tres vías de activación del complemento (**figura 3**): (i) vía clásica, activada por la interacción antígeno-anticuerpo; (ii) vía alternativa, activada por la interacción de estructuras de la superficie microbiana con el componente C3b y los factores B y D; (iii) la vía de la lectina, activada cuando la lectina de unión a manosa se une a residuos manosa presentes en la superficie bacteriana. Los procesos iniciales de las tres vías consisten en una secuencia de reacciones proteolíticas en las que los productos generados contribuyen a la activación del siguiente componente. Entre los subproductos de la activación del complemento hay anafilotoxinas, quimioatrayentes que causan reacciones inflamatorias en el sitio de deposición del complemento y atracción y activación de fagocitos. Las tres rutas convergen en la formación del enzima C3 convertasa, que rompe la proteína C3 produciendo el componente activo C3b a partir del cual se activan los componentes tardíos de complemento, efectores de la lisis de la bacteria.

La vía clásica es muy selectiva, y está acoplada a la inmunidad específica a través de los anticuerpos. Cuando un anticuerpo de isotipo IgM, IgA, IgG1, IgG2 o IgG3 (no IgG4, IgE, o IgD) se une al antígeno, se produce un cambio conformacional en su región Fc que permite la unión del primer componente de la vía clásica, C1q, y la activación de esta vía. Finalmente, la vía clásica resulta en la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC), formado por la unión de los componentes finales del complemento (C5-9). El MAC es altamente lipofílico y se inserta en las membranas bacterianas formando un canal cilíndrico transmembrana provocando la lisis celular. Los fragmentos C3a y C5a, liberados durante la activación del complemento, constituyen un potentísimo promotor de las funciones de los fagocitos y la inflamación.

La vía alternativa del complemento constituye un estado de activación permanente del componente C3 que genera C3b. En ausencia de antígenos

extraños, C3b es rápidamente inactivado por el factor I generando iC3b (C3b inactivo); sin embargo, ante la presencia de superficies activadoras como las paredes bacterianas, el C3b generado se unirá covalentemente a éstas quedando protegido de la acción del factor I, permitiendo la activación del complemento por la vía alternativa, induciendo la opsonización y activación de MAC.

La vía de la lectina se activa por la unión de la proteína lectina de unión a manosa (*mannan-binding lectin [MBL]*). Esta proteína se une a polisacáridos con residuos manosa, presentes únicamente en las superficies de células bacterianas. El complejo MBL-polisacárido se asemeja a los complejos de C1 de la vía clásica del complemento y fija los componentes C4, C2 y C3 a la superficie celular, catalizando también la formación del MAC y conduciendo a la lisis u opsonización de la célula bacteriana.

3.3.1.1. Regulación del sistema del complemento

Para impedir una activación inapropiada y daños en las células propias del huésped es necesaria una regulación precisa del sistema del complemento. Esta regulación se consigue a través de una serie de proteínas reguladoras, algunas de estas solubles y otras expresadas en la membrana de las células propias del huésped para protegerlas de la perforación por el MAC. Reguladores solubles como la proteína de unión a C4 (C4BP), el factor H (fH) y el inhibidor de C1 (C1-inh) están presentes en el torrente sanguíneo y en superficies mucosas, regulando la activación del complemento por reducción de la producción de la Convertasa de C3. Otros reguladores, como la proteína S, o vitronectina, y la clusterina, limitan la acción del complemento a nivel del complejo de ataque a membrana, inhibiendo la inserción del complejo C5b-7 en la membrana plasmática y la polimerización de C9. Moléculas de regulación negativa insertadas en las membranas de las

células del huésped aceleran la disociación de la convertasa de C3 en la propia membrana o impiden la unión de MAC a membranas propias.

3.3.1.2. Deficiencias en el sistema inmune relacionadas con el aumento de la susceptibilidad a la enfermedad meningocócica

El importante papel que juega el sistema del complemento en la respuesta inmune frente al meningococo se ve reflejado en el aumento de la susceptibilidad a la enfermedad en individuos con deficiencias en dicho sistema. Se han documentado numerosas deficiencias en componentes del complemento relacionadas con mayor una incidencia de infección y episodios infecciosos recurrentes. C3 es un componente central del sistema del complemento en el que confluyen las tres vías de activación, y cuya rotura a C3b pone en marcha los mecanismos bactericidas de lisis y de opsonofagocitosis. No es de extrañar, por lo tanto, que las deficiencias en C3 estén asociadas a un incremento de la susceptibilidad a la enfermedad meningocócica^{40,41}.

Una de las inmunodeficiencias hereditarias más comunes es la deficiencia de la MBL, asociada a la predisposición a un amplio rango de infecciones bacterianas⁴², existiendo tres variantes alélicas de la MBL asociadas a un incremento de la susceptibilidad a la infección meningocócica en niños⁴³. Sin embargo, son los individuos carentes de los componentes finales del complemento (C5-C9) aquellos que muestran una asociación más

⁴⁰ **Botto M, Fong KY, So AK, Barlow R, Routier R et al.** Homozygous hereditary C3 deficiency due to a partial gene deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89: 4957-4961.

⁴¹ **Peleg D, Harit-Bustan H, Katz Y, Peller S, Schlesinger M et al.** Inherited C3 deficiency and meningococcal disease in a teenager. *Pediatr Infect Dis J.* 1992; 11: 401-404.

⁴² **Gupta K, Gupta RK, Hajela K.** Disease associations of mannose-binding lectin & potential of replacement therapy. *Indian J Med Res.* 2008; 127: 431-440.

⁴³ **Salimans MM, Bax WA, Stegeman F, van Deuren M, Bartelink AK et al.** Association between familial deficiency of mannose-binding lectin and mutations in the corresponding gene and promoter region. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004; 11: 806-807.

estrecha con el incremento en la susceptibilidad a la enfermedad meningocócica, como muestran diversos estudios familiares^{44,45,46}. Aquellos individuos afectados ven incrementado el riesgo de enfermedad entre 1.000 y 10.000 veces en comparación con la población normal, pudiendo experimentar infecciones recurrentes⁴⁷.

El principal regulador de la activación de la vía alternativa es el fH. Recientemente se ha observado la unión de este regulador negativo a la superficie del meningococo mediante la lipoproteína fHbp (*factor H binding protein*), aprovechando su acción reguladora y aumentando así la supervivencia de la bacteria a la acción bactericida del suero⁴⁸. Los polimorfismos en el promotor del gen codificante para el fH determinan el nivel de esta molécula en suero e individuos que presentan polimorfismos que determinan niveles altos de fH en suero, resultan más susceptibles a la enfermedad.

Otros dos componentes del complemento cuya deficiencia se ha relacionado con la enfermedad meningocócica son los factores P y D. El factor P actúa estabilizando la convertasa de C3 de la vía alternativa. Las deficiencias relacionadas con este factor pueden ser debidas a una reducción de los niveles del factor P o a niveles normales de proteína no funcional. Han

⁴⁴ **Arnold DF, Roberts AG, Thomas A, Ferry B, Morgan BP et al.** A Novel Mutation in a Patient with a Deficiency of the Eighth Component of Complement Associated with Recurrent Meningococcal Meningitis. *J Clin Immunol.* 2009; 29: 691-695.

⁴⁵ **Rameix-Welti MA, Régnier CH, Bienaimé F, Blouin J, Schifferli J et al.** Hereditary complement C7 deficiency in nine families: subtotal C7 deficiency revisited. *Eur J Immunol.* 2007; 37: 1377-1385.

⁴⁶ **Rosa DD, Pasqualotto AC, de Quadros M, Prezzi SH.** Deficiency of the eighth component of complement associated with recurrent meningococcal meningitis--case report and literature review. *Braz J Infect Dis.* 2004; 8: 328-330.

⁴⁷ **van der Ende A, Hopman CT, Dankert J.** Multiple mechanisms of phase variation of PorA in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun.* 2000; 68: 6685-6690.

⁴⁸ **Haralambous E, Dolly SO, Hibberd ML, Litt DJ, Udalova IA et al.** Factor H, a regulator of complement activity, is a major determinant of meningococcal disease susceptibility in UK Caucasian patients. *Scand J Infect Dis.* 2006; 38: 764-771.

sido descritas tres variantes del factor P deficientes relacionadas con el aumento de la susceptibilidad, además de una mayor relación de mortalidad (33-75%)^{49,50}. La deficiencia en el factor D también está relacionada con incrementos de la susceptibilidad a la infección meningocócica^{51,52}.

3.3.1.3. Mecanismos de evasión de la acción del complemento

N. meningitidis dispone de distintos factores que le permiten evadir la acción del complemento. La presencia de estructuras propias de la bacteria, como la cápsula polisacáridica y los lipooligosacáridos, y la captación en su superficie de reguladores negativos de la cascada del complemento son las dos principales estrategias que permiten al meningococo aumentar su supervivencia en el torrente sanguíneo. La presencia de cápsula en todos los aislados obtenidos de pacientes sugiere la vital importancia de esta estructura en la virulencia del meningococo⁵³, especialmente si se compara con la menor frecuencia en portadores asintomáticos (30-70%)^{54,55}. En segundo lugar, cepas mutantes sin cápsula son altamente susceptibles a la acción del

⁴⁹ **Densen P, Weiler JM, Griffiss JM, Hoffmann LG.** Familial properdin deficiency and fatal meningococcemia. Correction of the bactericidal defect by vaccination. *N Engl J Med.* 1987; 316: 922-926.

⁵⁰ **Fijen CA, Kuijper EJ, Bulte MT, Daha MR, Dankert J.** Assessment of complement deficiency in patients with meningococcal disease in The Netherlands. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 98–105.

⁵¹ **Sprong T, Roos D, Weemaes C, Neeleman C, Geesing CL et al.** Deficient alternative complement pathway activation due to factor D deficiency by 2 novel mutations in the complement factor D gene in a family with meningococcal infections. *Blood.* 2006; 107: 4865-4870.

⁵² **Biesma DH, Hannema AJ, van Velzen-Blad H, Mulder L, van Zwieten R et al.** A family with complement factor D deficiency. *J Clin Invest.* 2001; 108: 233-240.

⁵³ **van Deuren M, Brandtzaeg P, van der Meer JW.** Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13: 144–166.

⁵⁴ **Caugant DA, Kristiansen BE, Froholm LO, Bovre K, Selander RK.** Clonal diversity of *Neisseria meningitidis* from a population of asymptomatic carriers. *Infect Immun.* 1988; 56: 2060–2068.

⁵⁵ **Ala'Aldeen DA, Neal KR, Ait-Tahar K, Nguyen-Van-Tam JS, English A et al.** Dynamics of meningococcal long-term carriage among university students and their implications for mass vaccination. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 2311–2316.

complemento⁵⁶. Como ya se ha comentado, cinco serogrupos causan la mayoría de los procesos infecciosos y aunque no está claro el motivo de esto, se ha propuesto que son propiedades intrínsecas a la cápsula las que promueven la mayor supervivencia en el torrente sanguíneo. Se ha descrito que el ácido siálico, presente en la cápsula de los serogrupos B, C, W-135 e Y, inhibe la cascada del complemento dentro del compartimento vascular y que limita la activación de la vía alternativa cuando está presente en la cápsula de patógenos⁵⁷, por lo que se ha postulado que podría ser responsable de dicha tendencia.

Los LOS representan otro importante factor que confiere resistencia al complemento. Existen doce variantes de LOS en *N. meningitidis* inmunológicamente distinguibles. Sin embargo, son los inmunitipos L3, L7 y L9 los predominantes en aislados de infecciones. Estos inmunitipos comparten la característica de que su cadena carbohidratada α contiene una fracción lacto-N-neotetraosa, que es idéntica a un antígeno de grupo sanguíneo humano⁵⁸. Por otro lado, los LOS L3, L7 y L9, así como L2 y L5, pueden ser modificados por sialización⁵⁹, lo que les confiere las características inhibitoras del sistema del complemento comentadas en el párrafo anterior, aunque para ciertos autores el papel de la sialización de LOS es más controvertido^{60, 61}.

⁵⁶ **Geoffroy MC, Floquet S, Metais A, Nassif X, Pelicic V.** Large-scale analysis of the meningococcus genome by gene disruption: resistance to complement-mediated lysis. *Genome Res* 2003; 13: 391–398.

⁵⁷ **Jarvis GA, Vedros NA.** Sialic acid of group B *Neisseria meningitidis* regulates alternative complement pathway activation. *Infect Immun.* 1987; 55: 174–180.

⁵⁸ **Tsai CM.** Molecular mimicry of host structures by lipooligosaccharides of *Neisseria meningitidis*: characterization of sialylated and nonsialylated lacto-N-neotetraose (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) structures in lipooligosaccharides using monoclonal antibodies and specific lectins. *Adv Exp Med Biol.* 2001; 491: 525–542.

⁵⁹ **Pavliak V, Brisson JR, Michon F, Uhrin D, Jennings HJ.** Structure of the sialylated L3 lipopolysaccharide of *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem.* 1993; 268: 14146–14152.

⁶⁰ **Reinisch N, Kiechl S, Mayr C, Schratzberger P, Dunzendorfer S et al.** Association of high plasma antioxidant capacity with new lesion formation in carotid atherosclerosis: a prospective study. *Eur J Clin Invest.* 1998; 28: 787–792.

Se ha constatado en diversos patógenos la capacidad de captar reguladores negativos del sistema del complemento de la fase soluble para aumentar su supervivencia en el suero⁶². *N. meningitidis* capta y une a su superficie los reguladores C4BP y fH a través de proteínas de membrana externa. C4BP actúa como regulador negativo en distintos puntos de la cascada del complemento, disociando la convertasa del C3 de las vías clásica y alternativa, y funcionando como cofactor en la rotura de C4b (componente de la convertasa de C3) mediada por el factor I. La unión de C4BP a la superficie bacteriana se realiza a través de la porina de membrana externa PorA⁶³. Sin embargo, a concentración salina fisiológica, esta unión resulta débil por lo que no está claro su significado en la patogénesis. El factor H se une a la superficie de *N. meningitidis* a través de la lipoproteína fHbp, protegiendo a la bacteria de lisis mediada por complemento debido a su papel como principal regulador de la vía alternativa. La presencia de la lipoproteína fHbp en todas las cepas examinadas hasta la fecha, su secuencia conservada y la posibilidad de inhibir su función mediante la unión de anticuerpos ha suscitado en ella un gran interés como antígeno vacunal⁶⁴.

3.3.2. Respuesta inmune celular

Mientras que el papel central de los anticuerpos bactericidas y del sistema del complemento en la protección frente al meningococo es ampliamente reconocido, la función de la respuesta inmune celular permanece menos clara. El creciente conocimiento sobre los mecanismos de

⁶¹ Estabrook MM, Griffiss JM, Jarvis GA. Sialylation of *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide inhibits serum bactericidal activity by masking lacto-N-neotetraose. *Infect Immun.* 1997; 65: 436-444.

⁶² Blom AM, Strategies developed by bacteria and virus for protection from the human complement system. *Scand J Clin Lab Invest.* 2004; 64: 479-496.

⁶³ Jarva H, Ram S, Vogel U, Blom AM, Meri S. Binding of the complement inhibitor C4bp to serogroup B *Neisseria meningitidis*. *J Immunol.* 2005; 174: 6299-6307.

⁶⁴ Pizza M, Donnelly J, Rappuoli R. Factor H-binding protein, a unique meningococcal vaccine antigen. *Vaccine.* 2008; 26: 46-148.

la iniciación de la respuesta inmune contra el meningococo adquirido en los últimos veinte años, ha revelado la crucial importancia de la activación de las células del sistema inmune innato en el desarrollo de una inmunidad humoral protectora⁶⁵. La contribución de la fagocitosis a la inmunidad innata contra *N. meningitidis* ha sido escasamente analizada debido a las dificultades técnicas de su estudio, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Los principales tipos celulares implicados en esta respuesta son los granulocitos neutrófilos (o células polimorfonucleares), las células dendríticas y los macrófagos. La importancia de los neutrófilos en la eliminación del meningococo ha sido constatada por su predominancia en el líquido cerebroespinal de pacientes con meningitis meningocócica, y por su temprana activación durante el proceso de infección^{66,67}. Han sido propuestos diferentes receptores en la superficie de los neutrófilos que interaccionan con *N. meningitidis* promoviendo la fagocitosis tanto por vía opsónica como no opsónica. Los neutrófilos humanos eliminan eficientemente los meningococos opsonizados a través de los receptores Fc-gamma. Entre éstos, FcγRII y FcγRIII, con distintas afinidades por distintos subtipos de IgG, tras detectar las modificaciones propias de la cadena constante de IgG que se producen tras la unión a los antígenos meningococales. La eliminación del meningococo por los neutrófilos ha sido constatada en sueros deficientes en los últimos componentes del sistema del complemento⁶⁷. En estudios realizados tras vacunación de individuos con vacunas polisacarídicas de los serogrupos A, Y y W-135, se ha observado un incremento de la fagocitosis

⁶⁵ **Schmitt C, Villwock A, Kurzai O.** Recognition of meningococcal molecular patterns by innate immune receptors. *Int J Med Microbiol.* 2009; 299: 9-20.

⁶⁶ **Peters MJ, Heyderman RS, Faust S, Dixon GL, Inwald DP et al.** Severe meningococcal disease is characterized by early neutrophil but not platelet activation and increased formation and consumption of platelet-neutrophil complexes. *J Leukoc Biol.* 2003; 7: 722-730.

⁶⁷ **Platonov AE, Vershinina IV, Käyhty H, Fijen CA, Würzner R et al.** Antibody-dependent killing of meningococci by human neutrophils in serum of late complement component-deficient patients. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003; 130: 314-321.

dependiente de anticuerpos específicos y del complemento⁶⁸ en los individuos vacunados. La captación opsonica de *N. meningitidis* también puede ser mediada por receptores de moléculas del sistema del complemento, como el receptor CR3, expresado en neutrófilos y monocitos. Paralelamente, los neutrófilos son capaces de captar y eliminar al meningococo de manera no opsonica mediante la unión de los receptores CEACAM a las proteínas Opa⁶⁹.

Las células dendríticas y los macrófagos son dos importantes tipos celulares especializados del sistema inmune innato. Estas células funcionan como nexo de unión entre la inmunidad innata y la adaptativa, y gobiernan el inicio y desarrollo de la respuesta inmune, debido a su doble papel como células fagocíticas y células presentadoras de antígenos⁵⁶. Para los serogrupos A, B y C, la expresión de la cápsula reduce notablemente el acoplamiento a células dendríticas y la fagocitosis. La sialización de lipooligosacáridos representa un segundo mecanismo de *N. meningitidis*, para escapar de la fagocitosis de células dendríticas⁷⁰. La infección de células dendríticas por *N. meningitidis* provoca un aumento de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad II (MCH) y una fuerte producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8), directamente correlacionadas con la severidad de la enfermedad meningocócica, al provocar inflamación local y facilitar al patógeno la invasión.

El papel que juegan los linfocitos B y T en la respuesta inmune muestra profundas diferencias, y la estimulación de unos u otros por los

⁶⁸ **Lowell GH, Smith LF, Griffiss JM, Brandt BL, MacDermott RP.** Antibody-dependent mononuclear cell-mediated antimeningococcal activity. Comparison of the effects of convalescent and postimmunization immunoglobulins G, M, and A. *J Clin Invest.* 1980; 66: 260-267.

⁶⁹ **Sarantis H, Gray-Owen SD.** The specific innate immune receptor CEACAM3 triggers neutrophil bactericidal activities via a Syk kinase-dependent pathway. *Cell Microbiol.* 2007; 9: 2167-2180.

⁷⁰ **Unkmeir A, Kämmerer U, Stade A, Hübner C, Haller S et al.** Lipooligosaccharide and polysaccharide capsule: virulence factors of *Neisseria meningitidis* that determine meningococcal interaction with human dendritic cells. *Infect Immun.* 2002; 70: 2454-2462.

distintos antígenos tendrá consecuencias determinantes en la inmunidad frente al meningococo. El polisacárido capsular ha demostrado ser un antígeno T-independiente⁷¹. Salvo excepciones como el polisacárido A⁷², el polisacárido capsular estimula las células B por unión con el receptor de células B (BCR), induciendo su diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos, pero sin estimular las células T, por lo que no se producen células B de memoria nuevas y se agota el reservorio de las ya existentes, lo que resulta en una menor respuesta, en subsiguientes dosis vacunales, además de resultar no inmunogénico en niños^{73,74}. Para que se genere y se mantenga memoria inmunológica se requiere la conjugación química de una proteína transportadora al polisacárido. De este modo se induce una respuesta T-dependiente, posibilitando la diferenciación de células T colaboradoras específicas, que a su vez ayudarán a la estimulación de células B productoras de anticuerpos y de memoria.

La protección a largo plazo a nivel de individuo depende de dos mecanismos: la persistencia de anticuerpos funcionales y el mantenimiento de memoria inmunológica. Aunque teóricamente las células B de memoria podrían conferir inmunidad a largo plazo, la velocidad con la que el meningococo invade y produce enfermedad, en un plazo de incluso horas, hace que la defensa por parte de estas células pueda ser demasiado lenta ya que requiere 4 días o más para su puesta en marcha, salvo en aquellos casos en los que el período de incubación es largo. Por lo tanto, la persistencia de anticuerpos funcionales, especialmente en los períodos de mayor índice de

⁷¹ **Coutinho A, Möller G.** Mitogenic properties of the thymus-independent antigen pneumococcal polysaccharide S3. *Eur J Immunol.* 1973; 3: 608-613.

⁷² **Muller E, Apicella MA.** T-cell modulation of the murine antibody response to *Neisseria meningitidis* group A capsular polysaccharide. *Infect Immun.* 1988; 56: 259-266.

⁷³ **MacLennan J, Obaro S, Deeks J, Lake D, Elie C et al.** Immunologic memory 5 years after meningococcal A/C conjugate vaccination in infancy. *J Infect Dis.* 2001; 183: 97-104.

⁷⁴ **Granoff DM, Pollard AJ.** Reconsideration of the use of meningococcal polysaccharide vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2007; 26: 716-722.

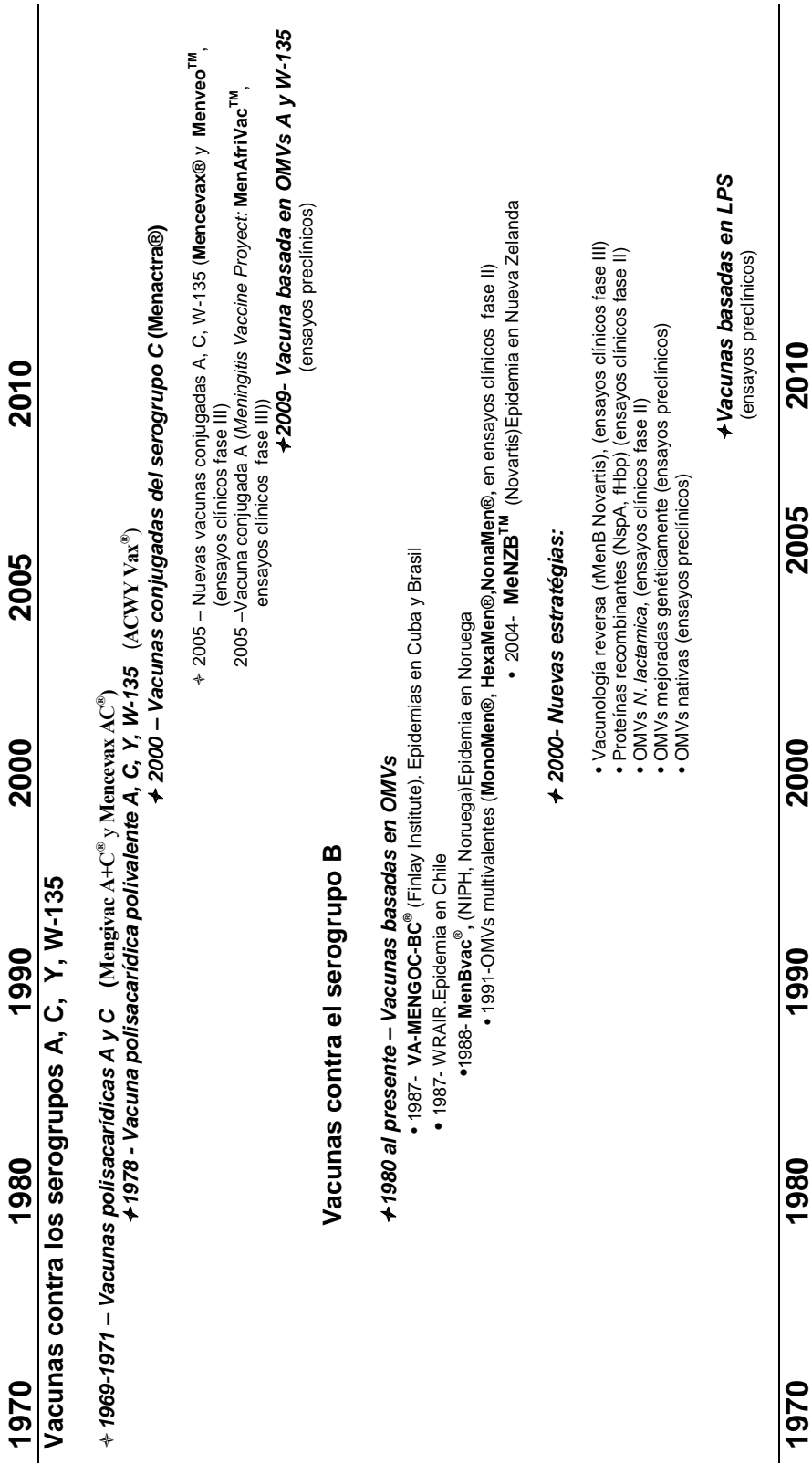
enfermedad, podría ser clave en la inmunidad individual y, al limitar el número de portadores, en la inmunidad poblacional⁷⁵.

4. Estrategias en el diseño de vacunas meningocócicas. Situación actual

A pesar de que se ha dispuesto de vacunas protectivas contra la enfermedad meningocócica desde hace treinta años (**figura 4**), todavía no existe una formulación que ofrezca protección contra todos los serogrupos causantes de enfermedad, debido especialmente a las serias dificultades que continúa ofreciendo el serogrupo B. Como se ha comentado anteriormente, el microorganismo ha desarrollado sofisticados mecanismos para evadir las defensas del huésped, como polisacáridos capsulares, lipooligosacáridos glicosilados con estructuras que imitan las de tejidos humanos, gran variabilidad antigénica, capacidad de reclutar reguladores negativos de la inmunidad humoral o transformación genética, dificultando así el diseño de formulaciones efectivas. Las estrategias seguidas en el diseño de vacunas contra los diferentes serogrupos han sido varias, alcanzando buenos resultados de eficacia en muchos de ellos incluso contra el serogrupo B, aunque en este último caso dicha eficacia se limita a la prevención de la enfermedad ante las cepas con las que han sido elaboradas.

⁷⁵ **Pollard AJ, Perrett KP, Beverley PC.** Maintaining protection against invasive bacteria with protein-polysaccharide conjugate vaccines. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9: 213-220.

Figura 4. Línea temporal del desarrollo de vacunas meningocócicas y estrategias seguidas (tomada y modificada de Stephens DS. 2007).



Los primeros pasos en el desarrollo de vacunas meningococales datan de principios del siglo XX. Los antígenos utilizados fueron células bacterianas muertas. Estos estudios fueron llevados a cabo con un control deficiente sin poder confirmar una inmunidad protectora generada⁷⁶. A finales de los años 60 el *Walter Reed Army Institute* (EEUU) trabajó con polisacáridos de los serogrupos A y C en respuesta a brotes epidémicos en reclutas norteamericanos, resultando seguros e inmunogénicos en humanos^{77,78}.

Posteriormente se desarrollaron vacunas polisacáridicas polivalentes, es decir, vacunas que incluyen en la misma formulación antígenos de diferentes serogrupos, inicialmente contra los grupos A y C, y posteriormente de cobertura ampliada a los grupos A, C, Y y W135.

La principal limitación de las vacunas polisacáridicas es que no inducen inmunidad T-dependiente^{79,80}. La ausencia de este tipo de inmunidad implica una pobre efectividad en niños, así como la incapacidad de generar memoria inmunológica a largo plazo^{81,82,83}.

⁷⁶ **Underwood EA.** Recent knowledge of the incidence and control of cerebrospinal fever. *Br. Med. J.* 1940; i: 757-763.

⁷⁷ **Gotschlich EC, Liu TY, Artenstein MS.** Human immunity to the meningococcus III. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B, and group C meningococcal polysaccharides. *J Exp Med.* 1969; 129: 1349-1365.

⁷⁸ **Gotschlich EC, Goldschneider I, Artenstein MS.** Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers. *J Exp Med.* 1969; 129: 1367-1384.

⁷⁹ **Kelly DF, Snape MD, Clutterbuck EA, Green S, Snowden C et al.** CRM197-conjugated serogroup C meningococcal capsular polysaccharide, but not the native polysaccharide, induces persistent antigen-specific memory B cells. *Blood.* 2006; 108: 2642-2647.

⁸⁰ **Kelly DF, Pollard AJ, Moxon ER.** Immunological memory: the role of B cells in long-term protection against invasive bacterial pathogens. *JAMA.* 2005; 294: 3019-3023.

⁸¹ **Leach A, Twumasi PA, Kumah S, Banya WS, Jaffar S et al.** Induction of immunologic memory in Gambian children by vaccination in infancy with a group A plus group C meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine. *J Infect Dis.* 1997; 175: 200-204.

⁸² **MacDonald NE, Halperin SA, Law BJ, Forrest B, Danzig LE et al.** Induction of immunologic memory by conjugated vs plain meningococcal C polysaccharide vaccine in toddlers: a randomized controlled trial. *JAMA.* 1998; 280: 1685-1689.

⁸³ **Goldblatt D.** Immunisation and the maturation of infant immune responses. *Dev Biol Stand.* 1998; 95: 125-132.

Experiencias con las vacunas conjugadas contra *Haemophilus influenza* y *Streptococcus pneumoniae*, han demostrado que la conjugación química de los polisacáridos a un transportador proteico permite que se induzca una respuesta T-dependiente⁸⁴. Siguiendo este procedimiento han sido desarrolladas diferentes vacunas conjugadas en base a los polisacáridos A, C, Y, y W135 (**tabla 1**). Estas vacunas han sido ampliamente evaluadas, obteniendo sueros con títulos altos de anticuerpos bactericidas y respuesta inmune estable⁸⁵.

Sin embargo, el polisacárido capsular del serogrupo B (ácido α -2,8 N-acetilneuramínico) es poco inmunogénico y su similitud con residuos glucosílicos presentes en proteínas de células humanas, como la molécula de adhesión NCAM de células del sistema nervioso⁸⁶, ha imposibilitado el desarrollo de una vacuna conjugada para el grupo B debido al riesgo de provocar una respuesta autoinmune.

En un intento por superar este problema, Jennings y colaboradores desarrollaron un polisacárido modificado químicamente que contiene grupos N-propionil en vez de N-acetil en la posición C5 de los residuos de ácido siálico. Las vacunas desarrolladas mostraron resultados muy prometedores en ratones⁸⁷ y primates no humanos⁸⁸, pero en un ensayo de fase I realizado en adultos

⁸⁴ **Robbins JB, Schneerson R, Anderson P, Smith DH.** The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. Prevention of systemic infections, especially meningitis, caused by *Haemophilus influenzae* type b. Impact on public health and implications for other polysaccharide-based vaccines. *JAMA*. 1996; 276: 1181-1185.

⁸⁵ **Reisinger KS, Baxter R, Block SL, Shah J, Bedell L, Dull PM.** Quadrivalent meningococcal vaccination in adults: A Phase III comparison of an investigational conjugate vaccine, MenACWY-CRM, with the licensed vaccine, Menactra. *Clin Vaccine Immunol*. 2009; 16: 1810-1815.

⁸⁶ **Finne J, Leinonen M, Makela PH.** Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis: implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet*. 1982; 2: 355-357.

⁸⁷ **Jennings HJ, Roy R, Gamian A.** Induction of meningococcal group B polysaccharide-specific IgG antibodies in mice using N-propionylated B polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. *J. Immunol*. 1986; 137: 1708-1713.

⁸⁸ **Fusci PC, Michon F, Tai JY, Blake MS.** Preclinical evaluation of a novel group B meningococcal conjugate vaccine that elicits bactericidal activity in both mice and non human primates. *J. Infect. Dis*. 1997; 175: 364-372.

voluntarios se comprobó que los anticuerpos inducidos carecen de actividad funcional⁸⁹.

En ausencia de vacunas polisacáridicas o conjugadas, el desarrollo de vacunas contra el grupo capsular B se ha basado en antígenos proteicos subcapsulares presentes en la superficie de la bacteria (**tabla 2**). Sin embargo, el diseño de vacunas de amplia protección basadas en componentes proteicos resulta complejo, especialmente cuando nos enfrentamos a un patógeno específico del ser humano que ha desarrollado múltiples mecanismos para evadir la respuesta inmune humana. Como resultado de la presión inmunoselectiva sufrida por la bacteria en el huésped, muchas proteínas de superficie muestran una gran diversidad en su secuencia aminoacídica, resultando en que los mejores antígenos diana, especialmente atractivos por su alta inmunogenicidad, sean también los más variables. Sin embargo el problema que supone la alta variabilidad antigénica podría ser abordado. Los análisis moleculares han mostrado que muchas variantes de estructuras antigénicas interesantes están relacionadas con linajes genéticos concretos, lo que simplifica en cierta medida el

⁸⁹ **Bruge J, Bouveret-Le Cam N, Danve B, Rougon G, Schulz D.** Clinical evaluation of a group B meningococcal N-propionylated polysaccharide conjugate vaccine in adult, male volunteers. *Vaccine*. 2004; 22: 1087-96.

Tabla 1. Vacunas disponibles y en desarrollo contra los serogrupos A, C, Y y W135 de *N. meningitidis*.

Vacunas Polisacarídicas			
Vacuna	Antígenos	Serogrupos	Disponibilidad
Mengivac A+C® <i>Sanofi-Pasteur</i>	Polisacárido (PS) A y C.	A, C	Disponible en España
Mencevax AC® <i>GlaxoSmithKline</i>	PS A y C.	A, C	Disponible en España
Mencevax ACW135® <i>GlaxoSmithKline</i>	PS A, C, y W-135	A, C y W-135	Utilizada desde 2003 en el cinturón de la meningitis africano.
Menomune® <i>Sanofi-Pasteur</i>	PS A, C, Y y W-135	A, C, Y y W-135	Autorizada en 1981
ACWY Vax® <i>GlaxoSmithKline</i>	PS A, C, Y y W-135	A, C, Y y W-135	Disponible en España por medicación extranjera. Dirigida al mercado de los peregrinos a La Meca
Vacunas Conjugadas Polisacárido-proteína			
Meningitec® <i>Wyeth Ltd.</i>	PS C conjugado a toxoide diftérico CRM ₁₉₇	C	Utilizada desde 1999 en UK
Menjugate® <i>Novartis</i>	PS C conjugado a toxoide diftérico CRM ₁₉₇	C	
NeisVac-C® <i>Baxter</i>	PS C conjugado a toxoide tetánico	C	
Menitorix™ <i>GlaxoSmithKline</i>	PS Hib y PS C conjugado a toxoide tetánico	C	
Nuevas Vacunas A, C, Y, W-135			
Menactra® <i>Sanofi-Pasteur</i>	PS A, C, Y y W-135 conjugado a CRM ₁₉₇	A, C, Y y W-135	Aprobada en 2005 para USA y Canadá. Uso autorizado para mayores de 2 años.
Mencevax® <i>GlaxoSmithKline</i>	PS A, C, Y y W-135 conjugado a toxoide tetánico	A, C, Y y W-135	Fase III comparándose con Menactra ^I
Menveo™ <i>Novartis</i>	Oligosacárido A, C, Y y W-135 conjugado a CRM ₁₉₇	A, C, Y y W-135	Fase III, comparándose con Menactra ^{II}
DTPv+HB/HibMenAC <i>GlaxoSmithKline</i>	PS A y C conjugado a toxoide tetánico.	A, C	Fase II ^{III}
MenAfriVac™ (Meningitis Vaccine Project)* <i>Serum Institute of India Ltd.</i>	PS A conjugado a toxoide tetánico	A	Fase II/III completada ^{IV}
MenC vaccine <i>Bio-Manguinhos/Fiocruz</i>	PS C conjugado a toxoide tetánico.	C	Fase I completada ^V
Vacuna OMVs bivalente	OMVs serogrupo A y W-135	A y W-135	Ensayos preclínicos ^{VI,VII}

Las referencias indicas en esta tabla se muestran en la página 221.

diseño de formulaciones. La resolución del problema de la variación antigénica de las proteínas se está enfocando desde dos puntos de vista diferentes. Por un lado está el desarrollo de formulaciones multivalentes que contienen las variantes más representativas de antígenos inmunodominantes, normalmente abundantes y variables, y por otro lado se apuesta por el uso de antígenos conservados, a menudo minoritarios, no inmunodominantes y con expresión fuertemente regulada. Este segundo enfoque ha sido posible gracias al gran avance experimentado por las técnicas de genética molecular en las últimas décadas.

Hasta la fecha las únicas formulaciones que han mostrado eficacia contra la enfermedad meningocócica del serogrupo B han sido aquellas basadas en vesículas de membrana externa (OMVs) monovalentes, desarrolladas en respuesta a brotes epidémicos causados por una cepa determinada. Las principales ventajas que presentan este tipo de vacunas es que las OMVs son un muestrario de antígenos proteicos representativo de la membrana externa del meningococo, y que la propia estructura de las vesículas posibilita que los antígenos de membrana expuestos en superficie conserven su estabilidad físico-química y puedan ser presentados en su conformación nativa. Además, durante su manufacturación, el contenido de LPS (endotoxina) se reduce considerablemente, mejorando sus características para uso parenteral. La eficacia de estas vacunas ha sido demostrada en Noruega (MenBvacTM)⁹⁰, Nueva Zelanda (MeNZB[®])^{91,92}, Chile⁹³, Cuba y Brasil (VA-Mengoc-BC[®])⁹⁴, áreas donde se han producido brotes epidémicos dominados por una cepa concreta.

⁹⁰ **Bjune G, Høiby EA, Grønnesby JK, Arnesen O, Fredriksen JH et al.** Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet*. 1991; 338: 1093-1096.

⁹¹ **Kelly C, Arnold R, Galloway Y, O'Hallahan J.** A prospective study of the effectiveness of the New Zealand meningococcal B vaccine. *Am J Epidemiol*. 2007; 166: 817-823.

⁹² **Wong SH, Lennon DR, Jackson CM, Stewart JM, Reid S et al.** Immunogenicity and tolerability in infants of a New Zealand epidemic strain meningococcal B outer membrane vesicle vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2009; 28: 385-390.

⁹³ **Boslego J, Garcia J, Cruz C, Zollinger W, Brandt B et al.** Efficacy, safety, and immunogenicity of a meningococcal group B (15:P1.3) outer membrane protein vaccine in Iquique, Chile. Chilean National Committee for Meningococcal Disease. *Vaccine*. 1995; 13: 821-829.

Tabla 2. Antígenos de membrana externa que están o han estado bajo estudio como candidatos vacunales frente al serogrupo B¹¹³.

Antígeno	Función	Características Antigénicas
Proteínas mayoritarias de membrana externa		
PorA	Porina catiónica	Antígeno inmunodominante protector. Induce anticuerpos bactericidas Presenta alta heterogeneidad antigénica. Principal antígeno de las vacunas aprobadas contra grupo B.
PorB	Porina aniónica	Proteína inmunogénica. Presenta heterogeneidad antigénica Escasa accesibilidad.
Proteínas de captación de Hierro		
TbpA	Receptor de transferrina	No induce anticuerpos bactericidas. Presenta heterogeneidad antigénica..
TbpB	Receptor de transferrina	Proteína inmunogénica y segura en estudios clínicos fase I. Escasa respuesta bactericida.
LbpA y LbpB	Receptor de lactoferrina	Inmunogénicas e inducen anticuerpos bactericidas en ratones. Reactividad cruzada limitada. No probadas en ensayos clínicos.
FetA	Receptor férrico enterobactina	Induce anticuerpos bactericidas específicos de cepa en animales. Los linajes hipervirulentos presentan pocas variantes de FetA. No probada en ensayos clínicos.
Adhesinas		
Nhha (GNA992)	Adhesión a células epiteliales	Induce anticuerpos bactericidas en ratones. Presenta regiones hipervariables Sueros de pacientes presentan anticuerpos frente Nhha.
App	Adhesión a células epiteliales	Induce anticuerpos bactericidas en ratones Secuencia aminoacídica altamente conservada. Anticuerpos específicos presentes en sueros de convalecientes pero no de portadores.
NadA (GNA1994)	Adhesión e invasión a células epiteliales	Induce anticuerpos bactericidas humanos con reactividad cruzada. Anticuerpos frente a NadA podrían bloquear la colonización. Ag incluido en la vacuna experimental rMenB Novartis en fase III
Opc	Adhesión e invasión a células epiteliales y endoteliales	Renaturalizada en liposomas, induce anticuerpos bactericidas en ratones. Baja variabilidad de secuencia Nivel de expresión variable entre cepas.
Opa	Unión íntima a la mucosa nasofaríngea	Antígeno inmunodominante. Induce anticuerpos bactericidas en humanos. Presenta variabilidad antigénica y de expresión.
PiliQ	Biogénesis de Pili tipo IV	El complejo PiliQ induce anticuerpos bactericidas en ratones. Secuencia relativamente conservada.

⁹⁴ **Sierra GV, Campa HC, Varcacel NM, García IL, Izquierdo PL et al.** Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann.* 1991; 14: 195-210.

Antígeno	Función	Características Antigénicas
Otros factores de virulencia		
fHbp (GNA1870)	Lipoproteína de unión a factor H	Induce anticuerpos bactericidas en animales. La unión de anticuerpos podría inhibir la unión del factor H, regulador negativo de la vía alternativa del complemento. Presente en todas las cepas conocidas, aunque presenta variabilidad de expresión entre cepas Antígeno incluido en las vacunas experimentales rMenB (Novartis) y rLP2086 (Weyth)
GNA33	Involucrada en la arquitectura de la membrana y división celular	Induce anticuerpos bactericidas en animales, posiblemente por mimetismo a un epitopo de PorA
Omp85	Transporte de lípidos y ensamblaje de OMPs	Inmunogénica pero no induce anticuerpos bactericidas.
LPS	Mimetismo antigénico	L3 y 7 detoxificados y sobreexpresados en OMVs induce anticuerpos bactericidas frente a cepas L3, L7, independientemente del serogrupo y con alta reactividad cruzada.
Antígenos con función desconocida		
NspA		Secuencia aminoacídica conservada Accesibilidad variable Induce anticuerpos bactericidas en humanos.
GNA2132		Anticuerpos anti-GNA2132 median la deposición de C3b en la membrana bacteriana. Induce anticuerpos bactericidas contra diferentes aislados
GNA2091*		Antígenos derivados de genoma de secuencia conservada y que inducen anticuerpos bactericidas en ratones.
GNA1030*		(*) inducen anticuerpos bactericidas en humanos son Ag de la vacuna experimental rMenB (Novartis)
GNA2132*		
GNA1162		
GNA1220		
GNA1496		
GNA2001		

La eficacia de estas vacunas fue establecida mediante los correspondientes ensayos clínicos (**tabla 3**), si bien en la comparación de los datos obtenidos debe considerarse que no se utilizaron los mismos rangos de edad ni la misma duración del período de observación en los distintos estudios. El análisis de los sueros posvacunales demostraron que los anticuerpos contra las proteínas PorA y Opc son los más importantes en la mediación de la actividad bactericida del suero, siendo la PorA la más inmunogénica de las proteínas, aunque en el estudio noruego se observó una clara evidencia de actividad bactericida originada por otras proteínas de membrana externa⁹⁵.

La respuesta de anticuerpos generada también parece mostrar un incremento de la opsonofagocitosis frente al meningococo. Todos estos estudios concluyeron en una eficacia total mayor del 50%, coincidiendo además en que las grandes diferencias de eficacia en función del rango de edad. Donde mayor eficacia se observó fue en el de adolescentes/adultos, alcanzando hasta un 87% de eficacia en adolescentes. Sin embargo, esta eficacia cae drásticamente en niños menores de dos años. Otra importante limitación de esta aproximación es que la respuesta inmune generada es específica de cepa en bebés y niños, ya que la actividad bactericida del suero va dirigida, como ya hemos comentado, principalmente contra la proteína hipervariable PorA, limitando el uso de la vacuna contra la cepa con la que fue elaborada o aquellas que comparten el subtipo.

Su manufacturación también presenta una serie de problemas a la hora de estandarizar su composición ya que el contenido preciso de proteínas de membrana externa, LPS o la presencia de adyuvante es de gran importancia en la inmunogenicidad de la misma. Aunque las proteínas cuantitativamente más importantes en estas formulaciones de OMVs son las proteínas de clase PorA,

⁹⁵ **Taha MK, Zarantonelli ML, Alonso JM, Naess LM, Holst J et al.** Use of available outer membrane vesicle vaccines to control serogroup B meningococcal outbreaks. *Vaccine*. 2007; 25: 2537-2538.

PorB, RmpM, Opc y una serie de proteínas reguladas por el hierro (como TbpA/B y FetA), su composición es mucho más compleja conteniendo incluso proteínas periplasmáticas y citoplasmáticas, lo que dificulta la estandarización de la composición final de las mismas, requisito necesario para su autorización.

Tabla 3. Estudios de eficacia de las vacunas basadas en vesículas de membrana externa de serogrupo B de *N. meningitidis* (tomada y modificada de Holst J, 2009).

Vacuna	años de vacunación	N° Dosis	Eficacia			
			Total	Adultos/ adolescentes	Niños	Bebés
WRAIR (OMVs/PS C)*	Chile 1987-1989	2	51%	70% (30 meses)**	-	-23% (30 meses)
VA-MENGOC-BC <i>Finlay</i> (OMVs/PS C)	Cuba 1987-1989	2	83% (16 meses)			
	Brasil 1990-1991		54%	74% >48 meses	74% De 24-47 meses	-37% <24 meses
MenBvac <i>NIPH</i> (OMVs)	Noruega 1988-1991	2	57% (29 meses)	87% (10 meses) 57% (29 meses)	-	-
MeNZB <i>NIPH/Novartis</i> (OMVs)	Nueva Zelanda 2004-2008	3	73% (24 meses)	73% (24 meses)	80% (24 meses)	85% (24 meses)
			69% (42 meses)	69% (42 meses)	De 1/2-5 años	De 1/2-3 años

* Antígeno

** Duración del estudio

En un intento de solucionar los inconvenientes observados en las vacunas de OMVs convencionales, grupos de investigación de entidades públicas y privadas desarrollan distintas estrategias para el diseño de una formulación que conserve la ventajas de las vacunas basada en OMVs y supere sus limitaciones (**tabla 4**).

Tras los buenos resultados obtenidos con las vacunas cubana y noruega frente a las cepas involucradas, se han diseñado cepas meningococales modificadas genéticamente que expresan diferentes tipos de PorA para obtener de este modo OMVs recombinantes (recOMV) multivalentes, reduciendo así el problema de la restricción de cepa. Siguiendo esta aproximación el *Netherlands Vaccine Institute* (NVI) han desarrollado dos formulaciones, “Hexamen”^{96,97} y “Nonamen”⁹⁸. Inicialmente, la vacuna hexavalente (Hexamen) fue desarrollada incluyendo los seis sero-subtipos (dos cepas con tres PorA diferentes cada una) que cubrían el 80% de todos los aislados clínicos de casos de enfermedad en Holanda. Los ensayos clínicos mostraron que HexaMen fue inmunogénica en bebés, preescolares y niños. Sin embargo, se requirieron múltiples dosis para alcanzar una actividad bactericida significativa y se encontraron diferencias en la magnitud de la respuesta frente a las diferentes PorA^{99, 100}. Nonamen incluye nueve PorA diferentes (OMVs de tres cepas recombinantes con tres PorA cada una) cubriendo el 75% de las cepas del serogrupo B a nivel mundial, según el NVI. Nonamen ha sido probada en adultos voluntarios resultando tolerable y sin

⁹⁶ **van der Ley P, van der Biezen J, Poolman JT.** Construction of *Neisseria meningitidis* strains carrying multiple chromosomal copies of the porA gene for use in the production of a multivalent outer membrane vesicle vaccine. *Vaccine*. 1995; 13: 401–407.

⁹⁷ **Claassen I, Meylis J, van der Ley P, Peeters C, Brons H et al.** Production, characterization and control of a *Neisseria meningitidis* hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine. *Vaccine*. 1996; 14: 1001–1008.

⁹⁸ **van den Dobbelsteen GP.** Nonamen, a multivalent MenB vaccine, from development to clinical studies. En: 2nd International Workshop on Neisserial Vaccines; 2009. p: 18.

⁹⁹ **de Kleijn ED, de Groot R, Lafeber AB, Labadie J, van Limpt KC et al.** Immunogenicity and safety of a hexavalent meningococcal outer-membrane-vesicle vaccine in children of 2–3 and 7–8 years of age. *Vaccine*. 2000; 18: 1456–1466.

¹⁰⁰ **Luijkx TA, van Dijken H, Hamstra HJ, Kuipers B, van der Ley P et al.** Relative immunogenicity of PorA subtypes in a multivalent *Neisseria meningitidis* vaccine is not dependent on presentation form. *Infect. Immun.* 2003; 71: 6367–6371.

efectos sistémicos. Actualmente se están preparando lotes clínicos para ensayos en adultos en fase II⁹⁸.

Entre otras aproximaciones, recientemente se han publicado buenos resultados de inmunogenicidad en ratones con una vacuna experimental que combina 13 serotipos de *Streptococcus pneumoniae* conjugados con la toxina diftérica atóxica CRM-197 junto con 9 PorA del meningococo B (NonaMen) desarrollada por el NVI¹⁰¹.

Por su parte, algunos grupos de investigación han propuesto vacunas basadas en OMVs mejoradas genéticamente en las que se regula la expresión de determinados antígenos. El *Walter Reed Army Institute of Research* (USA), ha desarrollado tres cepas modificadas genéticamente en las que cada cepa incluye 2 proteínas PorA diferentes, expresan diferentes inmunotipos de LOS y tienen una expresión incrementada de proteínas conservadas (Ej. fHbp, NadA, Opc), actualmente en estudios clínicos fase I¹⁰². Por su parte, Poolman y colaboradores (*GlaxoSmithKline Biologicals*, Bélgica) están realizando estudios preclínicos de diferentes formulaciones basadas en OMVs mejoradas en las que se han sobreexpresado proteínas minoritarias (Omp85, TbpA, Hsf, NspA) y reducido la expresión de PorA¹⁰³.

¹⁰¹ **van den Dobbelsteen GP, van Dijken HH, Pillai S, van Alphen L.** Immunogenicity of a combination vaccine containing pneumococcal conjugates and meningococcal PorA OMVs. *Vaccine*. 2007; 25: 2491-2496.

¹⁰² **Zollinger WD, Donets M, Brandt BL, Ionin B, Moran EE et al.** Multivalent group B meningococcal vaccine based on Native Outer Membrane Vesicles (NOMV) has potential for providing safe, broadly protective immunity. En: 16th International Pathogenic Neisseria Conference 2008; p: 51.

¹⁰³ **Weynants VE, Feron CM, Goraj KK, Bos MP, Denoël PA et al.** Additive and synergistic bactericidal activity of antibodies directed against minor outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*. 2007; 75: 5434-5442.

Tabla 4. Vacunas disponibles o en desarrollo contra el serogrupo B de *N. meningitidis*.

Vacunas basadas en OMVs				
Vacuna	Formulación	Etapas de desarrollo actual	Eficacia e inmunogenicidad	Ref.*
VA-MENGOC-BC® <i>Instituto Finlay, Cuba</i>	OMVs B:4:P1.19,15 Polisacárido grupo C	En calendario vacunal de Cuba desde 1991	Descenso de la mortalidad (98%) Eficacia total 87% Poco efectiva en niños <2 años	VIII
MenBvac® <i>NIPH, Holanda</i>	OMVs B:15:P1.7,16	Uso masivo contra brote epidémico en Noruega (1988-1991)	Eficacia total 57%	IX
MeNZB™ <i>Chiron Vaccines (Novartis)</i>	OMVs B:4:P1.7-2,4	Uso masivo contra brote epidémico en Nueva Zelanda desde 2004	Efectiva en todos los grupos de edad. Eficacia total 70%	X
Vacuna OMVs Bivalente Serogrupo B <i>Instituto Finlay, Cuba</i> <i>GlaxoSmithKline, Bélgica</i>	OMVs B:4:P1.19,15 B:4:P1.7-2,4	Fase I completada	Segura e inmunogénica. Induce Ac bactericidas. Cierta grado de reactividad cruzada con otras cepas.	XI
MenB-Bio <i>Bio-Manguinhos/Fiocruz, Brasil</i>	OMVs B:4,7:P1.19,15 B:4,7:P1.7,1 LOS detoxificados	Fase I completada	Eventos adversos suaves o moderados. Títulos actividad bactericida: 55-100%	XII,XIII
MonoMen® <i>NVI, Holanda</i>	OMVs monovalentes	Fase I completada		
HexaMen® <i>NVI, Holanda</i>	OMVs de dos cepas recombinantes trivalentes	Fase II completada	Segura e inmunogénica. Diferente incremento de anticuerpos bactericidas contra PorAs incluidas.	XIV,XV
NonaMen® <i>NVI, Holanda</i>	OMVs de tres cepas recombinantes trivalentes	Fase I completada	Bien tolerada e inmunogénica.	XVII, XVII
<i>N. lactamica</i> <i>HPA, Reino Unido</i>	OMVs de <i>N. lactamica</i>	Fase I completada	Inmunogénica y segura. Escaso incremento de títulos de actividad bactericida.	XVIII
NOMVs <i>WRAIR, USA</i>	OMVs nativas de cepa cápsula defectiva y con LOS no sializados	Fase I	Segura e inmunogénica.	XIX
Vacuna LOS detoxificados <i>GlaxoSmithKline, Bélgica</i>	OMVs PorA- con sobreexpresión de los LOS L2, L3 y L7 detoxificados	Ensayos preclínicos	Genera respuesta bactericida. Alta reactividad cruzada.	XX

*Las referencias indicas en esta tabla se muestran en la página 221.

Vacunas basadas en proteínas recombinantes				
Vacuna	Formulación	Etapas de desarrollo actual	Eficacia e inmunogenicidad	Ref.
rMenB <i>Novartis</i>	GNA1030-GNA2132 GNA2091-fHbp NadA OMVs B:4:P1.7-2,4	Fase III	Actividad bactericida en menores 1 año en el >93% de los casos contra las 3 cepas test.	XXI, XXII
rLP2086 <i>Wyeth</i>	fHbp subfamilia A fHbp subfamilia B	Fase I completada	Respuesta dependiente de dosis. 87% respuesta bactericida contra 5 de 6 cepas ensayadas. Resultados en niños no disponibles.	XIII, XIV
rNspA	NspA	Fase I completada	Poco inmunogénica en humanos.	XXV

Otros diseños se basan en OMVs de cepas mutantes defectivas en PorA y que sobreexpresan los lipooligosacáridos L3, L7 y L2 detoxificados por modificación genética¹⁰⁴. En ambos casos se han obtenido buenos resultados de reactividad cruzada de los sueros obtenidos contra un panel de cepas heterólogas. Koeberling y colaboradores¹⁰⁵ han mostrado que OMVs sobreexpresando las variantes V1 y V2 de la lipoproteína fHbp genera una mejor respuesta inmune que presentada como antígeno recombinante purificado.

El desarrollo de inmunidad natural contra *N. meningitidis* está asociada a la adquisición de anticuerpos bactericidas durante el primer año de vida, período en el que la proporción de portadores de *N. meningitidis* es bajo. Sin embargo, en este rango de edad la proporción de portadores de la especie no patógena *N.*

¹⁰⁴ Weynants V, Denoël P, Devos N, Janssens D, Feron C *et al.* Genetically modified L3,7 and L2 lipooligosaccharides from *Neisseria meningitidis* serogroup B confer a broad cross-bactericidal response. *Infect Immun.* 2009; 77: 2084-2093.

¹⁰⁵ Koeberling O, Giuntini S, Seubert A, Granoff DM. Meningococcal outer membrane vesicle vaccines derived from mutant strains engineered to express factor H binding proteins from antigenic variant groups 1 and 2. *Clin Vaccine Immunol.* 2009; 16: 156-162.

lactamica es alto, indicando que la adquisición de inmunidad natural en niños pequeños podría ser resultado de la colonización de la nasofaringe por ésta y otras especies no patógenas de *Neisseria*, u otras especies bacterianas con antígenos de superficie cross-reactivos. Esta circunstancia, junto con la existencia constatada de numerosos antígenos de superficie que generan anticuerpos con reactividad cruzada entre *N. meningitidis* y *N. lactamica*¹⁰⁶ y la no expresión de cápsula ni de la proteína inmunodominante e hipervariable PorA en *N. lactamica*, ha servido de fundamento para el desarrollo de una formulación basada en OMVs de *N. lactamica* por la *Health Protection Agency* (Reino Unido)^{107,108}. Sin embargo, los sueros obtenidos en ensayos preclínicos no han mostrado actividad bactericida salvo con la cepa homóloga, a pesar de existir reactividad cruzada. Los resultados mostraron que la protección observada en muridos frente a la bacteremia podría estar mediada por opsonofagocitosis¹⁰⁹. Recientemente se han publicado resultados de los ensayos clínicos en fase I con adultos voluntarios, resultando ser una vacuna segura e inmunogénica, en la que la respuesta humoral presenta reactividad cruzada; sin embargo, los títulos de actividad bactericida obtenidos han sido poco alentadores¹¹⁰.

El reciente avance de la genómica, la combinación entre el análisis *in silico* de la secuencias nucleotídicas y el conocimiento de la genómica estructural y funcional, han posibilitado nuevas estrategias para una identificación y obtención

¹⁰⁶ **Troncoso G, Sánchez S, Moreda M, Criado MT, Ferreirós CM.** Antigenic cross-reactivity between outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000; 27: 103-109.

¹⁰⁷ **Gorringe AR.** Can *Neisseria lactamica* antigens provide an effective vaccine to prevent meningococcal disease? *Expert Rev Vaccines.* 2005; 4: 373-379.

¹⁰⁸ **Gorringe A, Halliwell D, Matheson M, Reddin K, Finney M et al.** The development of a meningococcal disease vaccine based on *Neisseria lactamica* outer membrane vesicles. *Vaccine.* 2005; 23: 2210-2213.

¹⁰⁹ **Finney M, Vaughan T, Taylor S, Hudson MJ, Pratt C et al.** Characterization of the key antigenic components and pre-clinical immune responses to a meningococcal disease vaccine based on *Neisseria lactamica* outer membrane vesicles. *Hum Vaccine.* 2008; 4: 23-30.

¹¹⁰ **Gorringe AR, Taylor S, Brookes C, Matheson M, Finney M et al.** Phase I safety and immunogenicity study of a candidate meningococcal disease vaccine based on *Neisseria lactamica* outer membrane vesicles. *Clin Vaccine Immunol.* 2009; 16: 1113-1120.

rápida de antígenos. La aproximación conocida como vacunología reversa^{111, 112} utiliza la secuencia del genoma completo del patógeno de interés para la identificación *in silico* de nuevos antígenos, mediante la detección de genes codificantes para factores de patogenicidad y proteínas asociadas a membrana por algoritmos y herramientas computacionales específicos, cuya actividad es confirmada experimentalmente. Estos antígenos se denominan, en el caso de *N. meningitidis*, *Genomic-derived Neisserial Antigen* (GNA). Pizza M. y colaboradores, junto con el *The Institute for Genomic Research* han aplicado por primera vez esta estrategia con el objetivo de desarrollar una vacuna universal frente al serogrupo B. Tras secuenciar el genoma de la cepa MC58 (serogrupo B)⁹ y mediante el uso de herramientas computacionales se detectaron 600 posibles proteínas de membrana o secretables, de las cuales 355 fueron expresadas en sistemas heterólogos, purificadas y utilizadas para inmunizar ratones. De todos ellos se seleccionaron aquellos antígenos capaces de generar anticuerpos bactericidas, que presentasen una secuencia nucleotídica conservada en un panel de cepas representativo de diversidad genética global de la bacteria y que estuviesen presentes en los principales clones virulentos. Como resultado se obtuvo una mezcla de cinco antígenos (fHbp, NadA, GNA2132, GNA1030 y GNA2091) que son los componentes de la vacuna denominada 5CVMB.

La proteína fHbp es un antígeno de características muy interesantes ya que induce anticuerpos bactericidas mediado por complemento y que inhiben la unión de factor H a la superficie bacteriana incrementando la susceptibilidad de la bacteria a la lisis por complemento humano⁴¹. Los anticuerpos contra la adhesina

¹¹¹ **Bambini S, Rappuoli R.** The use of genomics in microbial vaccine development. *Drug Discovery Today*. 2009; 14: 252-60.

¹¹² **Serruto D, Serino L, Masignani V, Pizza M.** Genome-based approaches to develop vaccines against bacterial pathogens. *Vaccine*. 2009; 27: 3245-3250.

expuesta en superficie NadA, involucrada en la interacción con las células epiteliales humanas, podría prevenir la colonización por el meningococo¹¹³.

GNA2132 es una lipoproteína expuesta en superficie capaz de unir heparina, característica normalmente asociada al incremento de la adherencia a tejidos del huésped y resistencia al suero. Esta vacuna induce anticuerpos bactericidas en ratones contra el 78-90% de un panel de 85 cepas genéticamente diferentes¹¹⁴, es tolerable e inmunogénica en humanos. Los estudios en fase II demostraron que su reactividad cruzada es más limitada de lo esperada y por lo que se han incluido OMVs en su formulación. Actualmente se encuentra en ensayos clínicos Fase III^{115,116}.

Además de las mencionadas, otras proteínas de membrana, detectadas tanto por vacunología clásica como a partir del genoma, se encuentran en ensayos preclínicos o clínicos (**tabla 2**). Entre estas proteínas se incluyen numerosas adhesinas (Opc, Opa, NadA, App, Nhha o la proteína PiliQ), proteínas reguladas por hierro (TbpA y TbpB, LbpA y LbpB, FetA), y diversos antígenos derivados de genoma.

5. Epitopos conformacionales. Importancia de su estudio

Los epitopos de macromoléculas como las proteínas, se clasifican normalmente en dos categorías, epitopos continuos o lineales y epitopos discontinuos o conformacionales. Los epitopos continuos están formados por un

¹¹³ **Feavers IM, Pizza M.** Meningococcal protein antigens and vaccines. *Vaccine*. 2009; 27: 42-50.

¹¹⁴ **Giuliani MM, Adu-Bobie J, Comanducci M, Aricò B, Savino S et al.** A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 10834-10839.

¹¹⁵ **Rappuoli R.** The application of reverse vaccinology, Novartis MenB vaccine developed by design. 2008. En: 16th International Pathogenic Neisseria Conference, p:86

¹¹⁶ **Serruto D, Giuliane M, Comanducci M, Aricò B, Savino S et al.** A genome-based approach to identify novel Men B vaccine antigens. 2009. En: 2nd International workshop on Neisseria vaccines, p:12.

solo segmento aminoacídico de la cadena polipeptídica capaz de unir anticuerpos específicos contra la proteína intacta. Los epitopos conformacionales, por el contrario, están constituidos por múltiples segmentos discontinuos que se reúnen físicamente en el antígeno plegado en su estructura nativa. La mayoría de los epitopos de proteínas nativas reconocidos por los linfocitos B son conformacionales ($\approx 90\%$). Los linfocitos T, por el contrario, no reconocen antígenos proteicos nativos, sino epitopos correspondientes a péptidos lineales derivados del antígeno y presentados por el MCH¹¹⁷. Investigaciones recientes demuestran que epitopos inmunodominantes reconocidos por células B aparecen con las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas, algunos de ellos solo detectables en los complejos multiméricos y no en sus subunidades individuales¹¹⁸. Los sueros inmunes obtenidos tras la inmunización con antígenos que han perdido su conformación nativa total o parcialmente, proporcionarán una información sesgada sobre su inmunogenicidad al no mantener todos los epitopos que estas moléculas presentan *in vivo*, y que pudieran ser determinantes en la adquisición de inmunidad natural frente a un determinado patógeno. Los complejos proteicos de membrana externa representan una fuente de epitopos conformacionales y ya ha sido demostrada, tanto en *N. meningitidis*^{119, 120} como en *N. gonorrhoeae*^{121, 122} la existencia de algunos antígenicos.

¹¹⁷ **Arnon R, Van Regenmortel MH.** Structural basis of antigenic specificity and design of new vaccines. *FASEB J.* 1992; 6: 3265-3274.

¹¹⁸ **Ito HO, Nakashima T, So T, Hirata M, Inoue M.** Immunodominance of conformation-dependent B-cell epitopes of protein antigens. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 308: 770-776.

¹¹⁹ **Arakere G, Kessel M, Nguyen N, Frasch CE.** Characterization of a stress protein from group B *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol.* 1993; 175: 3664-3668.

¹²⁰ **Sánchez S, Abel A, Arenas J, Criado MT, Ferreirós CM.** Cross-linking analysis of antigenic outer membrane protein complexes of *Neisseria meningitidis*. *Res Microbiol.* 2006; 157: 136-142.

¹²¹ **Newhall WJ, Wilde CE, Sawyer WD, Haak RA.** High-Mr antigenic protein complex in the outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* 1980; 27: 475-482.

¹²² **Pannekoek Y, van Putten JPM, Dankert J.** Identification and molecular analysis of a 63-kilodalton stress protein from *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.* 1992; 174: 6928-6937.

OBJETIVOS E INTERÉS DEL TRABAJO

Hasta el momento, las únicas vacunas desarrolladas contra el serogrupo B que han demostrado ser eficaces han sido las vacunas de OMVs, resultando inmunogénicas y protectivas aunque presentan ciertos problemas como la restricción de cepa o la baja inmunogenicidad en niños pequeños. Gracias al importante desarrollo experimentado por la tecnología molecular y el creciente conocimiento de la biología y estructura del meningococo, ha sido posible abrir diversas estrategias en el diseño de nuevas vacunas más eficaces, aunque ninguna hasta el momento ha conseguido alcanzar los niveles de protección y cobertura deseados, por lo que la búsqueda de una formulación definitiva continúa.

A pesar de la dificultad que ofrece este serogrupo para obtener antígenos válidos, un alto porcentaje de la población adulta presenta inmunidad natural, por lo que tienen que existir antígenos protectores responsables de esta inmunidad. Al contrario de lo que ocurre en los demás serogrupos contra los que ya existen vacunas eficaces, el polisacárido capsular B no es un buen candidato vacunal debido a su baja inmunogenicidad y al riesgo de generar reacciones autoinmunes tras su uso como tal a causa de su similitud estructural con moléculas humanas. Debido a estas circunstancias, los antígenos subcapsulares, principalmente proteínas de membrana externa y lipooligosacáridos, han acaparado toda la atención en los estudios de potencialidad vacunal de antígenos.

Entre las distintas proteínas de membrana externa sometidas a estudio, se encuentran las porinas PorA y PorB, de gran importancia desde el punto de vista inmunogénico, especialmente la porina PorA, ya que es la principal responsable de la protección generada por las vacunas basadas en OMVs. Como han demostrado estudios anteriores en nuestro laboratorio, estas proteínas se encuentran en la membrana asociadas en complejos proteicos, formados por PorA, PorB y pudiendo estar acompañadas por otras proteínas como RmpM y FetA.

La hipótesis que se plantea en este trabajo es que los complejos proteicos presentes en la membrana externa podrían contener epitopos de naturaleza conformacional y conservados importantes para el desarrollo de la inmunidad natural. Las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas generan epitopos conformacionales que únicamente existen si se respetan estas conformaciones y que a menudo no son contemplados en estudios llevados a cabo con proteínas purificadas individualmente o con proteínas recombinantes sintetizadas a partir de secuencias genéticas en sistemas heterólogos.

El análisis de las características inmunogénicas de los complejos proteicos de membrana externa requiere un adecuado estudio del complexoma de membrana así como la caracterización de aquellos complejos de interés. Muchos de los trabajos publicados sobre complejos proteicos de *N. meningitidis* se basan en resultados obtenidos con proteínas recombinantes o cepas mutantes. Recientemente han sido descritas técnicas electroforéticas no desnaturalizantes que permiten el estudio de complejos proteicos minimizando la alteración de su conformación nativa, permitiendo, de este modo, trabajar con los complejos proteicos tal y como se encuentran en la célula.

Por lo tanto, los objetivos globales planteados en este trabajo son el estudio del complexoma de membrana externa de *N. meningitidis*, la caracterización de los complejos proteicos más relevantes y el análisis de sus características antigénicas. Finalmente se evaluará el interés de los complejos proteicos estudiados como antígenos vacunales frente al meningococo.

Para ello, los objetivos concretos planteados en este trabajo son los siguientes:

1. Estudio del complexoma de membrana externa de la cepa vacunal de *Neisseria meningitidis* H44/76 mediante la técnica electroforética nativa *high*

resolution Clear Native Electrophoresis (hrCNE).

2. Caracterización de los complejos proteicos mayoritarios mediante el uso de las electroforesis bidimensionales hrCNE/SDS-PAGE y hrCNE/hrCNE, e identificación de proteínas por espectrometría de masas, con especial atención a los complejos de porinas.
3. Purificación de complejos proteicos mayoritarios por elución pasiva a partir de gel.
4. Obtención de sueros inmunes de ratón frente a OMVs y a los complejos proteicos purificados, y caracterización de los mismos por Western-blotting.
5. Análisis de los sueros inmunes obtenidos mediante diferentes ensayos de funcionalidad de anticuerpos.
6. Evaluación de las consecuencias de la eliminación de los principales proteínas presentes en las OMVs en la respuesta inmune mediante el análisis de los sueros anti-OMVs mutantes.
7. Evaluación de los complejos proteicos de membrana externa purificados como componentes vacunales antimeningocócicos.

**CAPÍTULO I: Análisis y caracterización de los complejos proteicos
de membrana externa de *N. meningitidis***

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Proteínas de membrana externa de *N. meningitidis*

Debido a la intensa búsqueda de antígenos subcapsulares idóneos para ser incluidos en formulaciones vacunales, se ha realizado un exhaustivo análisis del proteoma de membrana externa de *N. meningitidis*. La secuenciación de, hasta la fecha, cinco genomas completos y tres en proyecto¹²³, ha posibilitado la deducción del proteoma de la bacteria, permitiendo la construcción de bases de datos de las secuencias aminoacídicas de las proteínas, estableciendo su función, en muchos casos, por homología con otros organismos.

La metodología clásica para el estudio del proteoma de un organismo o compartimento celular consiste en la separación de las proteínas por electroforesis bidimensional clásica (separación de los distintos polipéptidos por *pI* (1ª dimensión) y tamaño molecular (2ª dimensión)), seguida de la identificación de las mismas por inmunoensayos o por espectrometría de masas y búsqueda en bases de datos. Siguiendo esta metodología se ha estudiado la composición proteica de la membrana externa de varias cepas vacunales del serogrupo B^{124,125,126}. Los resultados de estos trabajos difieren en el número de OMP detectadas y la composición en ningún caso coincide al 100%, si bien la composición proteica depende de la cepa y de las

¹²³ <www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=16393>

¹²⁴ Williams JN, Skipp PJ, Humphries HE, Christodoulides M, O'Connor CD *et al.* Proteomic analysis of outer membranes and vesicles from wild-type serogroup B *N. meningitidis* and a lipopolysaccharide-deficient mutant. *Infect Immun.* 2007; 75: 1364-1372.

¹²⁵ Vipond C, Suker J, Jones C, Tang C, Feavers IM *et al.* Proteomic analysis of a meningococcal outer membrane vesicle vaccine prepared from the group B strain NZ98/254. *Proteomics.* 2006; 6: 3400-3413.

¹²⁶ Ferrari G, Garaguso I, Adu-Bobie J, Doro F, Taddei AR *et al.* Outer membrane vesicles from group B *Neisseria meningitidis* delta gna33 mutant: proteomic and immunological comparison with detergent-derived outer membrane vesicles. *Proteomics.* 2006; 6: 1856-1866.

condiciones ambientales y experimentales. A continuación revisaremos una serie de proteínas que, por su abundancia en la membrana, características inmunogénicas o su importancia en la biología y patogénesis del microorganismo, han sido estudiadas en profundidad.

1.1.1. Proteínas de clase

Las proteínas de clase constituyen las proteínas más abundantes de la membrana externa de *N. meningitidis*, e incluyen proteínas de diversa función. Esta clasificación establece 5 clases estructurales¹²⁷ de acuerdo con su peso molecular aparente, e incluyen las porinas PorA (clase 1) y PorB (clases 2 y 3), la proteína modificable por reducción o RmpM (clase 4) y las adhesinas Opa y Opc (clase 5).

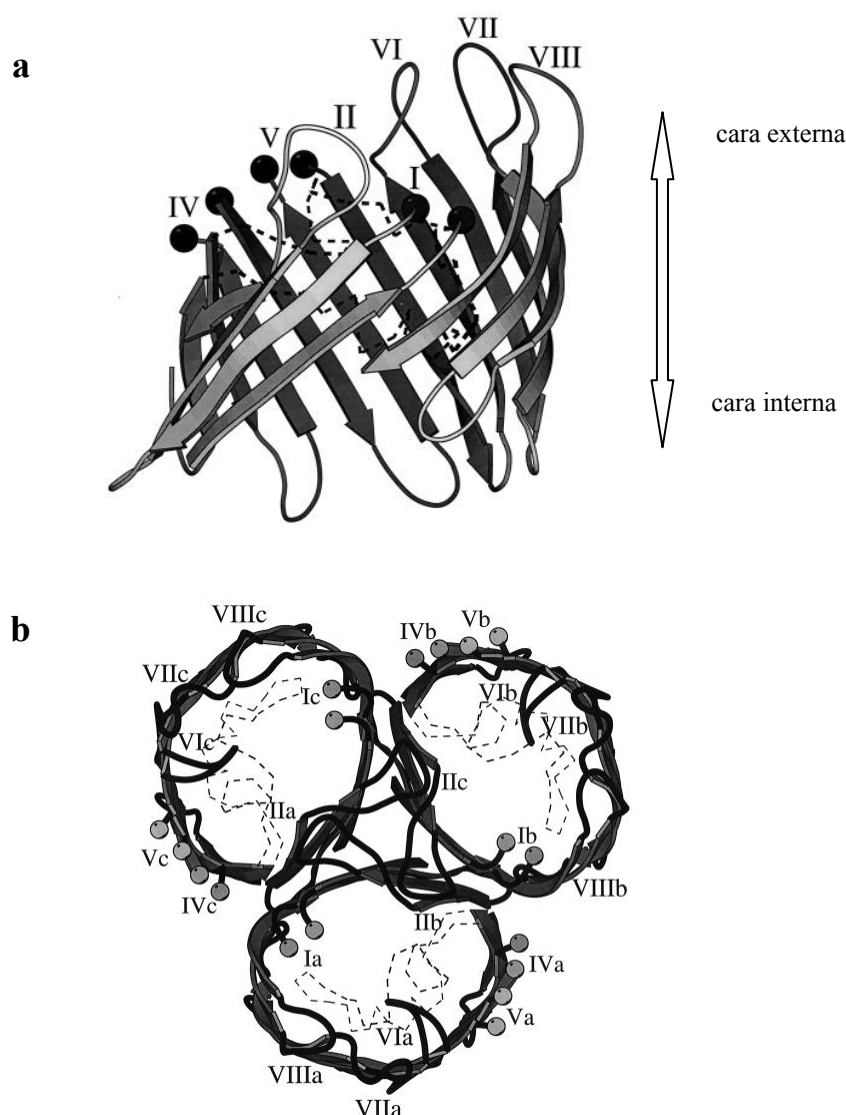
Porinas: las proteínas PorA y PorB pertenecen a la superfamilia de porinas de Gram-negativas¹²⁸. Las porinas son canales acuosos que permiten el flujo pasivo de pequeñas moléculas, nutrientes y productos de desecho, generalmente de manera no específica y determinado por tamaño molecular. Las porinas se asocian típicamente en trímeros, en los que cada subunidad mantiene su estructura de canal coexistiendo, por lo tanto, tres canales por trímero (**figura 5**). Este tipo de estructura ha sido descrita en distintos organismos como *Rhodobacter capsulatus*¹²⁹, *Rhodopseudomonas blastica*¹³⁰, *Escherichia coli*¹³¹ o *Neisseria meningitidis*¹³².

¹²⁷ Tsai CM, Frasch CE, Mocca LF. Five structural classes of major outer membrane proteins in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol.* 1981; 146: 69-78.

¹²⁸ Jeanteur D, Lakey JH, Pattus F. The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. *Mol. Microbiol.* 1991; 5: 2153–2164.

¹²⁹ Weiss MS, Schulz GE. Structure of porin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol.* 1992; 227: 493-509.

Figura 5. Modelos tridimensionales de la porina PorA y de un homotrímero de PorAs. (a) Estructura de β -barril propuesto para la proteína de membrana externa PorA. Los bucles externos, indicados con números romanos (I a VIII), unen 16 láminas beta transmembrana giradas 36° respecto a los planos creados por las membranas. (b) Modelo propuesto para un trímero de PorAs. El bucle III (en el interior de cada canal, representado en líneas segmentadas) sería el responsable de las propiedades de canal. El bucle II ha sido propuesto como responsable de la estabilidad del trímero (imágenes tomadas de Derrick JP, 1999).



- ¹³⁰ **Kreusch A, Schulz GE.** Refined structure of the porin from *Rhodopseudomonas blastica*. Comparison with the porin from *Rhodobacter capsulatus*. *J Mol Biol.* 1994; 243: 891-905.
- ¹³¹ **Cowan SW, Schirmer T, Rummel G, Steiert M, Ghosh R et al.** Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature.* 1992; 358: 727-733.
- ¹³² **Tomassen J, Vermeij P, Struyvé M, Benz R, Poolman JT.** Isolation of *Neisseria meningitidis* mutants deficient in class 1 (porA) and class 3 (porB) outer membrane proteins. *Infect Immun.* 1990; 58: 1355-1359.

Las porinas de *N. meningitidis* poseen una serie de propiedades muy particulares como la apertura de canal a potenciales de membrana bajos, la capacidad de transferirse a otras membranas cuando la distancia es suficientemente pequeña y funcionalidad en membranas tanto en eucariotas como en procariotas.

La proteína PorA o de clase I es exclusiva del meningococo dentro del género *Neisseria*. Sólo el gonococo comparte el gen *porA* aunque no lo expresa debido a mutaciones en su promotor¹³³. Su nivel de expresión presenta una considerable variabilidad y está sometida a variación de fase, aunque se ha encontrado en todos los aislados meningococales. Presenta un peso molecular de entre 44 y 47 kDa en función de la cepa y su diversidad antigénica es la base del sistema de serotipado. Su estructura secundaria contiene una alta proporción de láminas- β (~36%) lo que le confiere un motivo estructural predicho en forma de β -barril^{134,135} (**figura 5**). Un total de ocho bucles externos (I a VIII) unen las regiones transmembrana, siendo los más largos y expuestos los bucles I, IV, V y VI, y en menor medida VII y VIII. Los bucles I y IV contienen las secuencias hipervariables VR1 y VR2¹³⁶ respectivamente, donde se sitúan los epitopos de serotipado. Los lazos II y III, por el contrario, son conservados y se considera que juegan un papel estructural en el modelo tridimensional y en la funcionalidad del poro¹³⁴.

¹³³ **Feavers IM, Maiden MC.** A gonococcal *porA* pseudogene: implications for understanding the evolution and pathogenicity of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol.* 1998; 30: 647-656.

¹³⁴ **Derrick JP, Urwin R, Suker J, Feavers IM, Maiden MC.** Structural and evolutionary inference from molecular variation in *Neisseria* porins. *Infect Immun.* 1999; 67: 2406-2413.

¹³⁵ **Minetti CA, Tai JY, Blake MS, Pullen JK, Liang SM et al.** Structural and functional characterization of a recombinant PorB class 2 protein from *Neisseria meningitidis*. Conformational stability and porin activity. *J Biol Chem.* 1997; 272: 10710-10720.

¹³⁶ **McGuinness BT, Lambden PR, Heckels JE.** Class 1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*: epitope analysis of the antigenic diversity between strains, implications for subtype definition and molecular epidemiology. *Mol Microbiol.* 1993; 7: 505-514.

La proteína PorB o de clase 2 y 3, de entre 37 y 42 kDa, son los productos de dos alelos del locus *porB*, siendo ambos mutuamente excluyentes en las distintas cepas de *N. meningitidis*. Las secuencias aminoacídicas de las dos versiones proteicas muestran una similitud del 60-70%¹³⁷. Al igual que PorA, contiene una alta proporción de láminas- β (~36%) y una conformación de β -barril. La estructura cuaternaria propuesta también es trimérica. Topológicamente, también presenta ocho lazos aunque en este caso con un menor grado de variabilidad. Los lazos II y IV son los más conservados y parecen estar comprometidos en la estabilidad del trímero¹³⁸. El lazo II, también conservado se ha asociado a las propiedades de canal¹³⁹. La proteína PorB posee características que indican un importante papel en la interacción patógeno-huésped, con diversos efectos en las células eucariotas como la formación de poros y la prevención de apoptosis de las células infectadas, modulando el potencial de membrana mitocondrial¹⁴⁰.

La **RmpM** (*reduction modifiable protein M*) o proteína de clase 4 ha sido descrita como proteína de membrana externa, aunque todavía no está claro cómo se asocia a ella. Su peso molecular es de 24 kDa aunque la rotura de sus dos puentes disulfuro en condiciones reductoras proporciona una movilidad electroforética en SDS-PAGE correspondiente a 32 kDa. La RmpM se encuentra altamente conservada en todos los serogrupos, manteniendo un 99% de identidad de secuencia. Su extremo C-terminal guarda una gran similitud con el dominio C-terminal de la proteína OmpA de

¹³⁷ Minetti CA, Tai JY, Blake MS, Pullen JK, Liang SM *et al.* Structural and functional characterization of a recombinant PorB class 2 protein from *Neisseria meningitidis*. Conformational stability and porin activity. *J Biol Chem.* 1997; 272: 10710-10720.

¹³⁸ Fourel D, Bernadac A, Pagès JM. Involvement of exposed polypeptide loops in trimeric stability and membrane insertion of *Escherichia coli* OmpF porin. *Eur J Biochem.* 1994; 222: 625-30.

¹³⁹ Minetti CA, Blake MS, Remeta DP. Characterization of the structure, function, and conformational stability of PorB class 3 protein from *Neisseria meningitidis*. A porin with unusual physicochemical properties. *J Biol Chem.* 1998; 273: 25329-25338.

¹⁴⁰ Massari P, Ram S, Macleod H, Wetzler LM. The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. *Trends Microbiol.* 2003; 11: 87-93.

E. coli. Este dominio, encontrado en muchas proteínas de bacterias Gram-negativas, se ha sugerido que se asocia de manera no covalente con el peptidoglicano. La presencia de este dominio C-terminal de unión a peptidoglicano y la interacción descrita con proteínas integrales de membrana como la PorA y la PorB¹⁴¹, transportadores dependientes de TomB, TbpA y LbpA¹⁴², y la proteína Omp85 implicada en la biogénesis de OMPs, ha llevado a considerar una función intermediaria de anclaje de determinados complejos proteicos a la pared celular y estabilización de los mismos¹⁴³.

Las **Opa** y **Opc**, o proteínas de clase 5, desempeñan como principal función la adherencia e invasión de células epiteliales y endoteliales²⁵. La estructura predicha para las proteínas Opa es de β -barril, con ocho láminas β transmembrana conectadas por lazos cortos en la cara intracelular, y lazos largos en la extracelular, ambos con carácter hidrofílico¹⁴⁴. Los lazos expuestos en superficie presentan una región semivariable (SV) y dos regiones hipervariables (HV1 y HV2), presentando un considerable grado de variabilidad antigénica. Existe también gran variabilidad de expresión de estas proteínas debido a la presencia de 3-4 copias de los genes *opa*, situados en locus diferentes, sujetos a variación de fase y pudiéndose expresar ninguno, uno o varios de ellos¹⁴⁵. La Opc es estructuralmente diferente a las proteínas Opa, pues contiene diez regiones transmembrana y cinco lazos

¹⁴¹ **Jansen C, Wiese A, Reubsaet L, Dekker N, de Cock H et al.** Biochemical and biophysical characterization of in vitro folded outer membrane porin PorA of *Neisseria meningitidis*. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1464: 284-298.

¹⁴² **Prinz T, Tommassen J.** Association of iron-regulated outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* with the RmpM (class 4) protein. *FEMS Microbiol Lett*. 2000; 183: 49-53.

¹⁴³ **Grizot S, Buchanan SK.** Structure of the OmpA-like domain of RmpM from *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol*. 2004; 51: 1027-1037.

¹⁴⁴ **Malorny B, Morelli G, Kusecek B, Kolberg J, Achtman M.** Sequence diversity, predicted two-dimensional protein structure, and epitope mapping of neisserial Opa proteins. *J Bacteriol*. 1998; 180: 1323-1330.

¹⁴⁵ **Taha MK, Deghmane AE.** Informative talk between *Neisseria meningitidis* and host cells. En: Ferreirós CM, Criado MT, Vázquez J. (Eds.). *Emerging Strategies In The Fight Against Meningitis: Molecular and Cellular Aspects*. 2002; Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.

expuestos en superficie¹⁴⁶. Los niveles de expresión son también muy variables.

1.1.2. Proteínas de captación de hierro

La adquisición de hierro es un factor determinante en la patogénesis de meningococo por ser un nutriente de vital importancia. La mayor parte del hierro del huésped se encuentra unido a proteínas de unión a hierro, tanto en ambiente intracelular como en fluidos corporales, por lo que *N. meningitidis* ha desarrollado sistemas de captación de hierro¹⁴⁷, localizados en la membrana externa, capaces de utilizar el hierro transportado por la transferrina (complejo TbpAB), la lactoferrina (complejo LbpAB), la hemoglobina (sistema HmbR) y la haptoglobina-hemoglobina (complejo HpuAB), todos ellos transportadores TomB-ExbBD dependientes cuya expresión está regulada por *fur* teniendo al hierro como correpressor^{148,149,150,151}. Además, esta especie presenta un receptor para sideróforo exógeno enterobactina (FetA)¹⁵².

¹⁴⁶ Merker P, Tommassen J, Kusecek B, Virji M, Sesardic D *et al.* Two-dimensional structure of the Opc invasin from *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.* 1997; 23: 281-293.

¹⁴⁷ Perkins-Balding D, Ratliff-Griffin M, Stojiljkovic I. Iron transport systems in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68: 154-171.

¹⁴⁸ Legrain M, Mazarin V, Irwin SW, Bouchon B, Quentin-Millet MJ, Jacobs E *et al.* Cloning and characterization of *Neisseria meningitidis* genes encoding the transferrin-binding proteins Tbp1 and Tbp2. *Gene.* 1993; 130: 73-80.

¹⁴⁹ Pettersson A, Prinz T, Umar A, van der Biezen J, Tommassen J. Molecular characterization of LbpB, the second lactoferrin-binding protein of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* 1998; 27: 599-610.

¹⁵⁰ Stojiljkovic I, Hwa V, de Saint Martin L, O'Gaora P, Nassif X, Heffron F, So M. The *Neisseria meningitidis* haemoglobin receptor: its role in iron utilization and virulence. *Mol. Microbiol.* 1995; 15: 531-541.

¹⁵¹ Lewis LA, Gray E, Wang YP, Roe BA, Dyer DW. Molecular characterization of hpuAB, the haemoglobin-haptoglobin-utilization operon of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.* 1997; 23: 737-749.

¹⁵² Gorrings AR, Oakhill J. *Neisseria meningitidis*: Multiple Mechanisms To Acquire Iron. En: Ferreirós C., Criado M.T., Vázquez J. (Eds). *Emerging Strategies In The Fight Against Meningitis: Molecular And Cellular Aspects.* 2002. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.

Las proteínas TbpA y TbpB son un receptor de transferrina en la superficie del meningococo cuya expresión es inducida por condiciones de restricción de hierro. Este sistema capta el hierro transportado por la transferrina, y lo incluye en el periplasma, para ser posteriormente internalizado al citoplasma por el sistema FbpABC¹⁵³. La estructura de TbpA (93-98 kDa) es de β -barril, conteniendo 22 láminas β transmembrana y 11 lazos extracelulares de distinta longitud^{154,155}. La proteína TbpB se ha propuesto como una lipoproteína anclada a la membrana externa y que funcionaría junto con TbpA para formar el complejo receptor¹⁵⁶ TbpAB.

De manera similar, las proteínas LbpA y LbpB constituyen el receptor de lactoferrina LbpAB. Las proteínas LbpA y LbpB comparten similitudes con TbpA y TbpB, como una identidad aminoacídica del 25% y 33% respectivamente^{157,158,159}, y una estructura de β -barril. Se ha sugerido que estas similitudes podrían deberse a un receptor ancestro común¹⁵⁷.

La proteína HmbR y el complejo HpuAB son dos sistemas independientes que reconocen y transportan al periplasma grupos hemo a partir de hemoglobina y hemoglobina-haptoglobina respectivamente. La proteína FetA es un receptor exógeno de sideróforos similar a la FepA,

¹⁵³ **Khun HH, Kirby SD, BC Lee.** A *Neisseria meningitidis* *fbpABC* mutant is incapable of using nonheme iron for growth. *Infect. Immun.* 1998; 66: 2330-2336.

¹⁵⁴ **Buchanan SK.** Beta-barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. *Curr Opin Struct Biol.* 1999; 9: 455-461.

¹⁵⁵ **Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P.** Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol.* 2000; 37: 239-253.

¹⁵⁶ **Gómez JA, Criado MT, Ferreirós CM.** Cooperation between the components of the meningococcal transferrin receptor, TbpA and TbpB, in the uptake of transferrin iron by the 37-kDa ferric-binding protein (FbpA). *Res Microbiol.* 1998; 149: 381-387.

¹⁵⁷ **Gray-Owen SD, Schryvers AB.** Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol.* 1996; 4: 185-191.

¹⁵⁸ **Pettersson A, Klarenbeek V, van Deurzen J, Poolman JT, Tommassen J.** Molecular characterization of the structural gene for the lactoferrin receptor of the meningococcal strain H44/76. *Microb Pathog.* 1994; 17: 395-408.

¹⁵⁹ **Schryvers AB, Bonnah R, Yu RH, Wong H, Retzer M.** Bacterial lactoferrin receptors. *Adv Exp Med Biol.* 1998; 443: 123-133.

receptor exógeno de la enterobactina de *E. coli*. Al igual que el resto de transportadores de *N. meningitidis* presenta homología con las proteínas dependientes de TomB.

1.1.3. Otras proteínas

Los **pili tipo IV** son proyecciones filamentosas retráctiles de la superficie celular del meningococo, involucradas en diversas funciones biológicas del meningococo como la adhesión a las células epiteliales de la nasofaringe humana, la captura de ADN extracelular o el movimiento espasmódico (*twitching motility*). Los pili son un polímero helicoidal de la proteína denominada Pile, que esconde sus residuos conservados hacia el interior mientras que las regiones hipervariables son expuestas a la superficie. Su síntesis requiere la participación de una compleja maquinaria para su ensamblaje en la membrana interna y translocación a la membrana externa.

La **Omp85** es una proteína de unos 88 kDa, evolutivamente conservada, que juega un papel fundamental en el ensamblaje de proteínas^{160,161} en la membrana externa y, posiblemente, también de lípidos^{162,163}. Tal es su importancia que su gen codificante se haya presente en el genoma de todos los Gram-negativos secuenciados hasta el momento¹⁶⁴ y en las mitocondrias de las células eucariotas.

¹⁶⁰ **Bos MP, Tommassen J.** Biogenesis of the Gram-negative bacterial outer membrane. *Curr Opin Microbiol.* 2004; 7: 610-616.

¹⁶¹ **Wu T, Malinverni J, Ruiz N, Kim S, Silhavy TJ et al.** Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell.* 2005; 121: 235-245.

¹⁶² **Genevrois S, Steeghs L, Roholl P, Letesson JJ, van der Ley P.** The Omp85 protein of *Neisseria meningitidis* is required for lipid export to the outer membrane. *EMBO J.* 2003; 22: 1780-1789.

¹⁶³ **Doerrler WT, Raetz CR.** Loss of outer membrane proteins without inhibition of lipid export in an *Escherichia coli* YaeT mutant. *J Biol Chem.* 2005; 280: 27679–27687.

¹⁶⁴ **Bredemeier R, Schlegel T, Ertel F, Vojta A, Borissenko L. et al.** Functional and phylogenetic properties of the pore-forming beta-barrel transporters of the Omp85 family. *J Biol Chem.* 2007; 282: 1882-1890.

1.2. El estudio de los complejos proteicos de membrana

El sistema de membrana es una de las estructuras más importantes en los sistemas biológicos conteniendo proteínas que juegan papeles cruciales en la actividad biológica. En base a los resultados de diversos trabajos genómicos se estima que las proteínas de membrana representan entre el 25 y el 30% de todas las proteínas codificadas. Es tal su importancia que más del 70% de los fármacos disponibles actúan a nivel de las proteínas de membrana¹⁶⁵. Sin embargo, la investigación sobre proteínas de membrana permanece parcialmente explorada debido a diversas dificultades técnicas.

La mayoría de las proteínas, tanto citoplasmáticas como de membrana, desempeñan su función mediante la interacción con otras proteínas a través de las denominadas interacciones proteína-proteína (IPPs). Existe una gran diversidad de IPPs, pudiéndose clasificar en función de su composición (homómeros si se da entre polipéptidos idénticos y heterómeros si son diferentes), del tiempo de vida del complejo (complejos transitorios o permanentes) o si son obligadas o no obligadas¹⁶⁶.

Las dificultades en la investigación de complejos proteicos de membrana radican en la propia naturaleza de las proteínas de membrana y la debilidad de las fuerzas que a menudo sostienen estas estructuras. En el estudio de este tipo de complejos, las condiciones fisicoquímicas experimentales son determinantes para permitir la interacción entre proteínas, ya sea para interacciones transitorias o para interacciones permanentes. Esta condición supone un obstáculo en el estudio del complexoma de un organismo o compartimento celular, ya que en función de las condiciones experimentales utilizadas se pueden producir falsos positivos y

¹⁶⁵ **Byrne B, Iwata S.** Membrane protein complexes. *Curr Opin Struct Biol.* 2002 ; 12: 239-243.

¹⁶⁶ **Nooren IM, Thornton JM.** Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J.* 2003; 22: 3486-3492.

falsos negativos, resultando la elección de la técnica y la optimización de las condiciones en las que se desarrolla un punto crítico en el estudio de las IPPs.

Las proteínas de membrana son altamente hidrofóbicas y tienen una o varias regiones transmembrana, estableciendo una estrecha relación con los lípidos de membrana para mantener la estabilidad del complejo. El aislamiento de los complejos proteicos normalmente requiere la disyunción de la membrana en la que se encuentran insertados. Las proteínas de membrana fuera de esta plataforma física tienden a la agregación, adsorción y precipitación en solventes acuosos, conllevando a una pérdida de muestra y dificultando su análisis con ciertas técnicas, como las electroforéticas. El ambiente lipídico que rodea a los complejos proteicos de membrana proporciona un ambiente hidrofóbico estable para las regiones intermembrana, favoreciendo la interacción entre ellas y estabilizando la estructura del complejo. Para el aislamiento y análisis de los complejos de membrana, se hace indispensable, por lo tanto, disponer de una serie de agentes que permitan la extracción y solubilización de estas hidrofóbicas estructuras del ambiente lipídico que los rodea minimizando en la medida de lo posible la alteración estructural de los mismos¹⁶⁷.

Los agentes caotrópicos y los detergentes son utilizados extensamente en biología molecular para la solubilización de proteínas. Los agentes caotrópicos son agentes desnaturalizantes que estabilizan estados desplegados de las proteínas mediante enlaces no covalentes (Ej. urea, thiourea). Los detergentes son moléculas anfipáticas que contienen dominios hidrofóbicos e hidrofílicos. Esta estructura permite su autoasociación (como la formación de micelas) uniéndose a superficies hidrofóbicas como las encontradas en los dominios transmembrana. Los detergentes, en un sentido amplio, imitan el comportamiento de los lípidos, y

¹⁶⁷ **Hooker BS, Bigelow DJ, Lin CT.** Methods for mapping of interaction networks involving membrane proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 363: 457-461.

se distinguen por la concentración a la que se autoasocian o el tipo de estructuras que forman.

Existen cuatro tipos principales de detergentes en función de su capacidad para solubilizar y desnaturalizar proteínas integrales de membrana¹⁶⁸: i) iónicos de cadena lineal, ii) no iónicos, iii) ácidos biliares, iv) zwitteriónicos. Los agentes caotrópicos, los detergentes iónicos de cadena lineal (como el dodecilsulfato de sodio [SDS]), y los detergentes zwitteriónicos son sustancias fuertemente desnaturizantes, por lo que no son apropiadas para el estudio de complejos proteicos. Únicamente los detergentes no iónicos y los ácidos biliares son apropiados, debido a su moderado potencial de alteración de la membrana y por ser "desnaturizantes suaves". Los detergentes no iónicos más utilizados son el n-dodecil- β -D-maltosido (DDM), el *p*-isooctilfenoxi-poli-etoxietanol (Triton X-100 [TX100]) y la digitonina¹⁶⁹. Debido a que estos detergentes rompen preferentemente las interacciones lípido-lípido o lípido-proteína antes que interacciones proteína-proteína, son considerados detergentes suaves y, por lo tanto, apropiados para la solubilización de complejos proteicos nativos. Los ácidos biliares, como el deoxicolato sódico (DOC), son detergentes iónicos pero poseen propiedades significativamente diferentes a los de cadena lineal. Son compuestos estereoidales con cara polar y cara apolar y menor capacidad de alteración de la membrana, por lo tanto, también válidos para la solubilización de complejos proteicos de membrana¹⁶⁸.

¹⁶⁸ **Speers AE, Wu CC.** Proteomics of integral membrane proteins--theory and application. *Chem Rev.* 2007; 107: 3687-3714.

¹⁶⁹ **Kashino Y.** Separation methods in the analysis of protein membrane complexes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003; 797: 191-216.

1.3. Técnicas para el análisis de complejos proteicos

Actualmente existe una gama cada vez más amplia de métodos para el estudio de interacciones entre proteínas^{170,171,172} que se adaptan a las exigencias de los distintos tipos de interacciones en cuanto a sensibilidad y agresividad. La afinidad entre proteínas que interactúan entre sí puede variar en varios órdenes de magnitud, desde rápidas reacciones enzima-sustrato a interacciones estables de complejos proteicos constitutivos, por lo que resulta de vital importancia la correcta elección del método analítico para obtener un resultado fiable.

1.3.1. Métodos electroforéticos no desnaturalizantes

Las aproximaciones basadas en electroforesis en gel son herramientas especialmente válidas en proteómica funcional. En primer lugar, las proteínas son separadas de manera intacta, sin ser alteradas, posibilitando su posterior fraccionamiento y correcta caracterización. Según el sistema electroforético escogido, pueden separarse proteínas hidrosolubles y proteínas hidrofóbicas solubilizadas en un solo experimento, obteniendo una representación fiable del proteoma presente en la muestra de partida. A diferencia de muchos otros métodos, en los que solo se detectan interacciones binarias entre proteínas, los sistemas electroforéticos pueden analizar en un único experimento un amplio abanico de complejos sin restringirse a unas pocas proteínas y sus proteínas compañeras de complejo como ocurre en la inmunoprecipitación o cromatografía de afinidad. La capacidad de análisis se reduce cuando se aplican al estudio de interacciones transitorias de corta vida de duración, o

¹⁷⁰ **Lalonde S, Ehrhardt DW, Loqué D, Chen J, Rhee SY et al.** Molecular and cellular approaches for the detection of protein-protein interactions: latest techniques and current limitations. *Plant J.* 2008; 53: 610-635.

¹⁷¹ **Miernyk JA, Thelen JJ.** Biochemical approaches for discovering protein-protein interactions. *Plant J.* 2008; 53: 597-609.

¹⁷² **Berggård T, Linse S, James P.** Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics.* 2007; 7: 2833-2842.

cuando la afinidad entre proteínas es tan baja que la interacción se ve alterada por la presencia de detergentes en el proceso de aislamiento de las proteínas.

Se han desarrollado distintos sistemas electroforéticos apropiados para el estudio de determinados complejos proteicos solubles y de membrana, como las electroforesis *native IEF*¹⁷³ o la SDS-PAGE con baja concentración de SDS¹⁷⁴, aunque los sistemas en gel más versátiles y robustos son los recientemente desarrollados por Schägger H. y colaboradores para el estudio de complejos proteicos respiratorios mitocondriales. Las técnicas denominadas *Blue Native Electrophoresis* (BNE)¹⁷⁵, *Clear Native Electrophoresis* (CNE)¹⁷⁶ y *high resolution Clear Native Electrophoresis* (hrCNE)¹⁷⁷ han demostrado ser técnicas muy versátiles y robustas para el estudio de complejos proteicos, especialmente para complejos proteicos de membrana, solventando de manera sencilla y eficaz los problemas provocados por la alta hidrofobicidad que caracteriza este tipo de proteínas¹⁷⁸.

La BNE, la CNE y la hrCNE comparten características como el uso de geles en gradiente de poliacrilamida como soporte electroforético y el mantenimiento de condiciones no desnaturizantes mediante uso de detergentes suaves y un pH regulado entre 7.0 y 7.5, minimizando aquellas situaciones que puedan alterar la estructura cuaternaria de las proteínas. Las

¹⁷³ Yokoyama R, Iwafune Y, Kawasaki H, Hirano H. Isoelectric focusing of high molecular weight protein complex under native conditions using agarose gel. *Anal Biochem.* 2009; 387: 60-63.

¹⁷⁴ Reinman S, Thornber JP. The electrophoretic isolation and partial characterization of three chlorophyll-protein complexes from blue-green algae. *Biochim Biophys Acta.* 1979; 547: 188-197.

¹⁷⁵ Schägger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem.* 1991; 199: 223-231.

¹⁷⁶ Schägger H, Cramer WA, von Jagow G. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem.* 1994; 217: 220-230.

¹⁷⁷ Wittig I, Karas M, Schägger H. High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol Cell Proteomics.* 2007; 6: 1215-1225.

¹⁷⁸ Wittig I, Schägger H. Native electrophoretic techniques to identify protein-protein interactions. *Proteomics.* 2009, 9: 5214-5223.

principales diferencias entre estas tres técnicas radican en los principios que determinan la separación y migración electroforética de los complejos proteicos, que a continuación serán estudiados con más detalle.

El componente más importante en la BNE es el colorante aniónico Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB). Tras la solubilización de los complejos de membrana con detergentes neutros no desnaturizantes y la eliminación por centrifugación del material no solubilizado, la inclusión de CBB a la muestra y al tampón de electroforesis de cátodo evita la formación de agregados por repulsión electrostática gracias a la unión en exceso del colorante a la superficie de las proteínas, principalmente a residuos de arginina. Además, el colorante proporciona la carga negativa necesaria para su migración hacia el ánodo, independientemente del punto isoeléctrico intrínseco de la proteína. Este colorante se une eficientemente a regiones hidrofóbicas confiriendo un comportamiento propio de proteínas solubles a las proteínas de membrana. La separación de las proteínas no se produce de acuerdo con la relación carga/masa como ocurre en la SDS-PAGE, sino únicamente por el tamaño de las proteínas al atravesar el gel en gradiente de poliacrilamida, con un tamaño de poro decreciente. Cada proteína o complejo proteico migrará hasta alcanzar un tamaño de poro específico que impida su migración. Por lo tanto, todas aquellas proteínas susceptibles de ser teñidas por el pigmento CBB, tanto proteínas de membrana como solubles, podrán ser separadas por esta técnica. Únicamente aquellas proteínas solubles que no unan CBB y que posean un *pI* neutro o básico a pH 7.0 no migrarán o lo harán hacia el cátodo debido a su carga neta neutra o positiva respectivamente. Otro problema inherente a la técnica es que la combinación de CBB con los detergentes neutros utilizados en la solubilización inicial genera micelas aniónicas mixtas que pueden imitar algunas características de

los detergentes aniónicos¹⁷⁹, de tal modo que las subunidades sensibles a detergentes pueden ser disociadas y, por lo tanto, pueden desensamblarse estructuras supramoleculares. El CBB presenta otra limitación: la unión del colorante a las proteínas puede interferir en ensayos fluorimétricos y de actividad catalítica por lo que CNE y hrCNE se hacen más apropiadas para este tipo de pruebas.

En la CNE no se añade el colorante aniónico CBB durante la preparación de la muestra ni en el tampón de cátodo, y por lo tanto la separación se limita a proteínas con un *pI* que proporcione carga neta cero a pH neutro, pH al que se encuentran los geles y tampones electroforéticos. Este sistema resulta mucho más compatible con ensayos de actividad catalítica *in-gel* y detección de marcadores fluorescentes respecto a la BNE. Al no estar presente el CBB las condiciones son más suaves y permite aislar estructuras supramoleculares sensibles de disociación por las micelas mixtas aniónicas detergente neutro-Coomassie. Como desventaja, la CNE muestra una mayor formación de agregados durante la electroforesis y menor resolución que la BNE.

Con el objetivo de diseñar un sistema que preservase las ventajas de BNE y CNE y eliminase sus desventajas, recientemente se ha desarrollado una versión de alta resolución de la CNE, denominada hrCNE. Este sistema, al igual que CNE, no utiliza CBB como agente aniónico, eliminando de este modo las desventajas que este pigmento provoca en la BNE. La ausencia del pigmento permite ensayos de actividad catalítica en gel y no se producen interferencias con ensayos fluorimétricos. Para evitar la agregación de las proteínas de membrana y proporcionar carga negativa para la migración

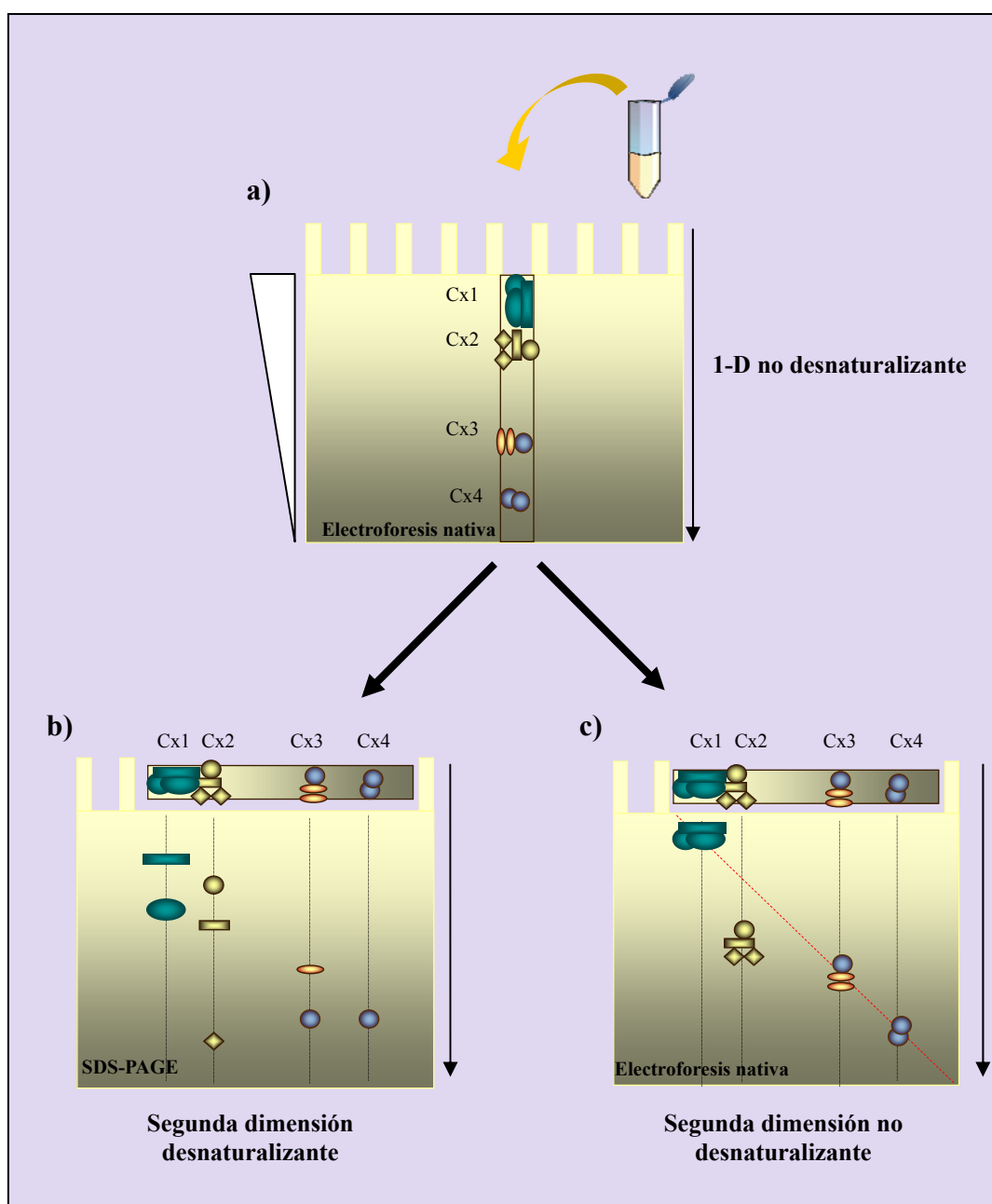
¹⁷⁹ **Neff D, Dencher NA.** Purification of multisubunit membrane protein complexes: isolation of chloroplast FoF1-ATP synthase, CFo and CF1 by blue native electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 259: 569-575.

electroforética sin utilizar CBB, este sistema incluye detergentes neutros y aniónicos en el tampón de cátodo. Éstos formarán micelas mixtas que solubilizarán e impondrán carga negativa a las proteínas de manera análoga al CBB. Los detergentes utilizados para este fin son el DOC como detergente aniónico, y DDM o TX100 como detergentes neutros, especialmente suaves debido a la baja concentración de detergente que requieren para la formación de micelas. Debido a la inclusión del anión DOC, este sistema es más agresivo para las interacciones proteína-proteína que la BNE, pero el gran enfoque conseguido la convierte en una excelente herramienta.

Los diferentes complejos separados por cualquiera de estos sistemas pueden ser sometidos a un posterior análisis multidimensional para obtener información acerca de los subcomplejos o subunidades constituyentes, y resolver posibles solapamientos entre complejos co-migrantes (**figura 6**). La electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE disocia completamente los complejos proteicos en sus unidades constitutivas, por lo que aplicando una segunda dimensión en SDS-PAGE a partir de una tira de gel de una primera dimensión nativa, se obtiene un mapa proteico que muestra las proteínas constituyentes de los complejos separados en la primera dimensión (1-D). Hay dos normas de interpretación generales para el análisis de este tipo de mapas bidimensionales. En primer lugar, todos los puntos proteicos alineados verticalmente tras la segunda dimensión (2-D) en SDS-PAGE son potencialmente subunidades de un complejo proteico (**figura 6b**). En segundo lugar, puntos situados en la misma línea horizontal representan, potencialmente, la misma proteína que se localiza en complejos proteicos de distinta peso molecular. Sin embargo, dependiendo de la resolución del sistema electroforético utilizado, más de un complejo proteico pueden coincidir en el mismo tamaño molecular y más de una proteína puede co-migrar durante la SDS-PAGE.

Los complejos proteicos pueden, a su vez, asociarse para formar supercomplejos. Una 2-D en SDS-PAGE, como hemos visto, informa sobre las subunidades proteicas que forman un complejo proteico. Sin embargo, utilizando una 2-D con otro sistema nativo diferente, o el mismo variando las condiciones, es posible romper el supercomplejo en los distintos complejos que lo forman o , por otro lado, separar complejos solapados en la primera dimensión por tener el mismo tamaño molecular pero distinta composición. Como representa la **figura 6c**, hipotéticos complejos co-migrantes aislados en una 1-D hrCNE, podrían ser sometidos a una 2-D hrCNE/hrCNE en la que, utilizando una combinación o concentración diferente de detergentes, se generarían movilidades electroforéticas distintas.

Figura 6. Esquema explicativo de la separación y análisis electroforético de complejos proteicos. a) La utilización de técnicas electroforéticas no desnaturizantes (nativas), permite la separación en gel de proteínas y complejos proteicos por tamaño molecular ($Cx1 > Cx2 > Cx3 > Cx4$). b) La primera dimensión nativa puede ser sometida a una segunda dimensión desnaturizante, rompiendo los complejos en sus subunidades constituyentes. c) La aplicación de una segunda dimensión con un sistema nativo diferente al empleado en la primera, puede resolver la co-migración de complejos de tamaño molecular similar ($Cx1$ y $Cx2$).



1.3.2. Otros métodos utilizados en el estudio de interacciones proteína-proteína

Co-inmunoprecipitación: la co-inmunoprecipitación^{171,180} es una técnica diseñada para el análisis de las interacciones entre una proteína conocida y aquellas con las que pueda interaccionar, bien formando un complejo estable, bien interaccionando de manera transitoria con la suficiente afinidad. El método implica el uso de anticuerpos específicos contra una proteína específica que, al incubarse con una muestra proteica compleja, formarán inmunocomplejos anticuerpo-proteína específica. La proteína específica puede estar interaccionando con otras proteínas, por lo que participarán en el inmunocomplejo y podrán ser copurificadas. Las principales ventajas de la inmunoprecipitación son su especificidad, su relativa sencillez y la compatibilidad con la mayoría de métodos para análisis posteriores (SDS-PAGE, inmunoblotting, espectrometría de masas, etc.). Sin embargo, la dificultad ocasional en la obtención de anticuerpos de alta especificidad y avidez reduce la capacidad de esta técnica.

Cross-linking: las condiciones necesarias para aislar y purificar una determinada proteína son casi siempre diferentes a las que se dan *in vivo*. Tras la lisis de la célula o compartimiento celular, las proteínas son diluidas y expuestas a multitud de pequeñas moléculas que desestabilizan interacciones entre proteínas. El uso de agentes químicos de *cross-linking*¹⁸⁰ es una vía para evitar la desestabilización de interacciones. Los agentes químicos *cross-linker* consisten en dos grupos reactivos unidos por un “brazo” molecular, solubles, pudiendo ser capaces de atravesar membranas lipídicas y fraccionables. El *cross-linker* se unirá covalentemente a dos péptidos a través de sus grupos reactivos, estabilizando las asociaciones presentes en el momento que se

¹⁸⁰ **Phizicky EM, Fields S.** Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev.* 1995; 59: 94-123.

añade. Tras la estabilización de la interacción, las proteínas pueden ser separadas por SDS-PAGE, descomponiendo el complejo en sus partes constituyentes. El formaldehído es uno de los más utilizados debido a su escaso coste, su capacidad para inactivar proteasas y la escasa distancia entre los grupos reactivos (2 Å). Desafortunadamente, resultan estabilizadas tanto asociaciones específicas como inespecíficas, problema que se acentúa cuanto mayor sea la distancia entre los grupos reactivos del *cross-linker*.

Fluorescencia por transferencia de energía resonante: los métodos basados en transferencia de energía resonante^{170, 181}, denominados fluorescencia por transferencia de energía resonante (FRET) y bioluminiscencia por transferencia de energía resonante (BRET), permiten visualizar la interacción de proteínas en complejos proteicos en células vivas. Consisten en la transferencia de energía desde un cromóforo en estado activado, unido a una proteína conocida X, a una molécula aceptor, unida a una proteína conocida Y, resultando en el incremento de fluorescencia del aceptor si X e Y forman complejo. El rango efectivo de transferencia de energía se sitúa por debajo de los 10 nm, distancia similar al descrito para los complejos de proteínas multiméricos observados en los sistemas biológicos¹⁸². Aunque esta metodología no genera muchos falsos positivos, la tasa de falsos negativos es bastante alta ya que si las dos proteínas incógnita, compañeras de complejo, se encuentran separadas por más de 10 nm la transferencia de energía no será efectiva.

Resonancia de plasmón superficial (SPR): SPR se basa en medición de los cambios registrados en el índice de refracción cuando se unen proteínas

¹⁸¹ **Ciruela F.** Fluorescence-based methods in the study of protein-protein interactions in living cells. *Curr Opin Biotechnol.* 2008; 19: 338-343.

¹⁸² **Sheng M, Hoogenraad CC.** The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem.* 2007; 76: 823-847.

purificadas a una fase sólida.¹⁸³ Esta aproximación está limitada a aquellas proteínas que pueden ser expresadas y purificadas y hay que tener en cuenta que la unión de una proteína a una fase sólida puede afectar a su capacidad para formar complejos.

Etiquetas de afinidad: el uso de proteínas recombinantes etiquetadas permite el aislamiento y purificación de complejos proteicos *in vivo* por afinidad. Las proteínas son expresadas como proteínas quimera formadas por una proteína cebo y otra proteína (Ej.: GST, proteína de unión a manosa o péptido de unión a calmodulina) o una cadena corta de aminoácidos (Ej.: hexahistidina) a modo de etiqueta. Tras su expresión *in vivo* o su incubación con un lisado celular, la proteína cebo formará los correspondientes complejos proteicos y estos podrán ser recuperados por la unión de la etiqueta a un soporte sólido. Tras la elución de las proteínas, éstas pueden ser separadas por electroforesis en gel e identificadas por espectrometría de masas. Esta técnica resulta eficaz para proteínas que se expresan abundantemente en la célula¹⁸⁴, o de cinética de disociación baja. Otra limitación de la técnica es la elevada tasa de falsos positivos debido a uniones inespecíficas a la proteína cebo o a la columna empleada para la purificación. El uso de proteínas artificiales genera por su parte una serie de problemas, la etiqueta puede interferir negativamente en la unión de algún componente del complejo, perdiendo información acerca del mismo. Si la etiqueta queda oculta en el interior del complejo, no podrá ser recuperado.

La purificación por afinidad en tándem (TAP-Tag) reduce en gran medida las uniones no específicas en comparación con otras técnicas de afinidad. La etiqueta fusionada a la proteína específica consiste en dos

¹⁸³ **Cooper MA.** Label-free screening of bio-molecular interactions. *Anal Bioanal Chem.* 2003; 377: 834–842.

¹⁸⁴ **von Mering C, Krause R, Snel B, Cornell M, Oliver SG, Fields S, Bork P.** Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature.* 2002; 417: 399-403.

etiquetas de afinidad secuenciales separadas por un lugar de rotura de la proteasa de virus del mosaico del tabaco¹⁸⁵, por lo que son necesarias dos columnas de afinidad para la purificación reduciendo el número de uniones inespecíficas. Las principales desventajas del método son la pérdida de proteínas de interacciones de baja afinidad durante los lavados y se requiere gran cantidad de material de partida para la purificación e identificación de subunidades poco representadas.

Sistema de doble híbrido: el sistema de doble híbrido (Y2H) es un método ampliamente utilizado en el estudio de interacciones proteína-proteína. Y2H se basa en el hecho de que muchos activadores de expresión eucariotas tienen dos dominios funcionales distintos, uno de unión al promotor de la secuencia de ADN y otro activador de la transcripción. Utilizando levaduras como sistema de expresión heterólogo, se construyen dos plásmidos, uno codificando para la proteína cebo fusionada al dominio de unión a promotor y otro codificando para la proteína diana fusionada al dominio de activación de la transcripción. Tras la coexpresión de ambos plásmidos, la interacción de las proteínas cebo y diana induce la transcripción de un gen marcador en el núcleo.

Esta metodología detecta interacciones *in vivo* y es sensible a interacciones transitorias, sin embargo se limita a interacciones binarias y presenta una tasa alta de falsos positivos¹⁸⁶ (hasta el 50%) y falsos negativos¹⁸⁷ (64%), requiriendo la comprobación de los resultados mediante otros métodos. Otra limitación de esta aproximación es la dificultad de

¹⁸⁵ **Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Séraphin B.** A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol.* 1999; 17: 1030-1032.

¹⁸⁶ **Sprinzak E, Sattath S, Margalit H.** How reliable are experimental protein-protein interaction data? *J Mol Biol.* 2003; 11: 919-923.

¹⁸⁷ **Deng M, Mehta S, Sun F, Chen T.** Inferring domain-domain interactions from protein-protein interactions. *Genome Res.* 2002; 12: 1540-1548.

estudiar la interacción de proteínas con importantes dominios hidrofóbicos como las proteínas integrales de membrana, debido a la formación de agregados. Con el fin de solventar este problema se ha desarrollado la técnica *mating-based split-ubiquitin system* (mbSUS)¹⁸⁸, en la que tras la interacción de las proteínas en la membrana se libera un factor de transcripción que inducirá a la transcripción de un gen marcador en el núcleo.

En el presente capítulo estudiaremos el complexoma de membrana externa de la cepa H44/76 utilizando la electroforesis nativa hrCNE y las electroforesis bidimensionales hrCNE/hrCNE y hrCNE/SDS-PAGE seguidas de identificación de proteínas por espectrometría de masas. Los resultados se compararán con las cepas mutantes y heterólogas recogidas en la **tabla 5**.

¹⁸⁸ **Miller JP, Lo RS, Ben-Hur A et al.** Large scale identification of yeast integral membrane protein interactions. 2005. *Proc Nat Acad Sci USA*; 102: 12123-12128.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas bacterianas utilizadas y características

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo y sus características se describen en la **tabla 5**. Las cepas 3061, 3063, H44/76 y las cepas mutantes *knock-out* PorA-, PorB- y FetA- fueron cedidas por el Dr. I. M. Feavers (*Division of Bacteriology, National Institute for Biological Standards and Control, South Mimms, Reino Unido*). El mutante *knock-out* RmpM- fue cedido por el Dr. E. Rosenqvist (*Division of Infectious Disease Control, Norwegian Institute of Public Health [NIPH], Noruega*). La cepa salvaje H44/76 es la cepa vacunal utilizada por el Instituto Nacional Noruego de Salud Pública para desarrollar la vacuna de OMVs MenBvac⁹⁰, y a partir de ésta se obtuvieron las cepas mutantes PorA-, PorB-, RmpM- y FetA-, defectivas en las proteínas de membrana externa PorA, PorB, RmpM y FetA respectivamente.

La cepa NZ98/254, utilizada para el desarrollo de la vacuna de OMVs MeNZB¹⁸⁹ fue cedida por la Dr.^a D. R. Martin (*Institute of Environmental Science and Research, Kenepuru Science Centre, Porirua, Nueva Zelanda*). Las cepas Nm26 y Nmp27 pertenecen de la colección del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia (Universidad de Santiago de Compostela). La cepa *N. meningitidis* Nm26 fue aislada del líquido cefalorraquídeo de un paciente en el antiguo Hospital Xeral de Santiago. La cepa Nmp27 procede de la orofaringe de un individuo sano de nuestra comunidad autónoma.

¹⁸⁹ **Oster P, Lennon D, O'Hallahan J, Mulholland K, Reid S et al.** MeNZB: a safe and highly immunogenic tailor-made vaccine against the New Zealand *Neisseria meningitidis* serogroup B disease epidemic strain. *Vaccine*. 2005; 23: 2191-2196.

La caracterización de las cepas de *N. meningitidis* de la colección del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la USC (serogrupo, serotipado, subtipado y MLST) se realizó en el Laboratorio de Referencia de Meningococos del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III (Madrid).

Tabla 5. Relación de cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Serogrupo	Serotipo/ subtipo	ST/ ET
H44/76	B	15:P1.7,16	ST-32,ET-5
PorA-	B	15: (-)	ST-32,ET-5
PorB-	B	(-):P1.7,16	ST-32,ET-5
RmpM-	B	15:P1.7,16	ST-32,ET-5
FetA-	B	15:P1.7,16	ST-32,ET-5
NZ98/254	B	15:P1.7-2,4	ST-41
3061	B	4:P1.7-2,4	ST-41, Burst 5
3063	B	1:P1.22,14	ST-213, Burst 8
Nm26	B	4:P1.16	-
NmP27	Aa	15:P1.7,16	-

Aa: autoaglutinante

2.2. Conservación de las cepas

Las bacterias fueron conservadas a -80 °C, suspendidas en una solución estéril de leche descremada al 10% (p/v). A partir de los viales originales se realizó un aislamiento en estría en medio Choc-Iso. Tras incubar 24 horas a 37 °C en atmósfera húmeda enriquecida en CO₂ (5%), se realizó un césped a partir de una colonia aislada para ser incubado 8 horas en las condiciones anteriores. El césped fue recuperado y resuspendido en leche descremada y repartido en partes alícuotas de 300 µL.

2.3. Condiciones de cultivo

A partir de dos céspedes bacterianos crecidos en medio Choc-Iso enriquecido con Biovitex al 1% (Bioline, Milán, Italia), se preparó una suspensión bacteriana en medio líquido Mueller-Hinton (Oxoid, Unipath Ltd. Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) ajustada a unos valores de absorbancia a 540 nm de entre 1,6 y 1,8. A partir de esta suspensión se inocularon 8 mL en un matraz de 2 L con 400 mL de medio líquido Mueller-Hinton al que se le añadió Desferal (Deferoxamina mesilato [Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, Missouri, EEUU]) como quelante de hierro a una concentración de 100 μ M con el fin de obtener condiciones de restricción de hierro. La incubación se realizó a 37 °C en baño termostático con agitación de vaivén (70 oscilaciones por minuto) durante 12 horas, momento en el que se alcanzó la fase exponencial tardía de la curva de crecimiento.

2.4. Obtención de las vesículas de membrana externa (OMVs)

2.4.1. Extracción de OMVs con Prensa de French

Las OMVs se obtuvieron siguiendo una variación del protocolo descrito por Gómez y colaboradores¹⁵⁶. Tras 12 horas de incubación, se procedió a la muerte de las células por calor, sumergiendo los matraces en un baño a 56 °C durante una hora. Las células se recuperaron por centrifugación (10 minutos, 10 000 \times g, 4 °C). La pellet resultante se resuspendió en agua MilliQ a razón de 4 mL por cada gramo de pellet (peso húmedo), para finalmente ser sometidas a 3 pases por Prensa de French a una presión de 1,1 \times 10⁵ kPa. El material obtenido se centrifugó durante 10 minutos a 10 000 \times g y 4 °C para precipitar células enteras y restos celulares. El sobrenadante se ultracentrifugó (10 minutos, 200 000 \times g, 4 °C) y el precipitado se resuspendió en agua MilliQ con azida sódica al 0,02% (p/v). La concentración de proteína se

determinó por el método BCA¹⁹⁰ siguiendo las instrucciones del fabricante (BCA Protein Assay Reagent, Pierce, Rockford, IL, EEUU). Finalmente se almacenaron a -80 °C.

2.4.2. Extracción con deoxicolato sódico

Las vesículas de membrana externa de las cepas H44/76, PorA-, PorB-, RmpM- y FetA- utilizadas para la inmunización de ratones se obtuvieron con método de extracción con deoxicolato sódico, siguiendo una variación del protocolo de Fredicksen y colaboradores¹⁹¹. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que en el método anterior. El cultivo celular se centrifugó a 50 000 \times g durante una hora para decantar las células, que posteriormente se resuspendieron en tampón Tris-HCl 0,1M con EDTA 0,01M y deoxicolato sódico 0,5% (p/v), utilizando un volumen de 7,5 mL por gramo de peso húmedo de células. La suspensión resultante se centrifugó a 200 000 \times g durante 10 minutos y la pellet se resuspendió en Tris-HCl 0,05M con sacarosa al 3% (p/v). Al igual que en el método anterior, la concentración de proteína se determinó utilizando el método BCA.

2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se realizó utilizando geles verticales de poliacrilamida (PA) en presencia del detergente aniónico SDS, utilizando el sistema de tampón discontinuo de Laemli¹⁹². La electroforesis se llevó a cabo en un sistema Mini-PROTEAN[®] 3

¹⁹⁰ **Smith PK, Krohm RI, Hermason GT, Mallia AK, Gartner FM et al.** Measurent of protein using Bicinchonic acid. *Anal. Biochem.* 1985; 150: 76-85

¹⁹¹ **Fredriksen JH, Rosenqvist E, Wedege E, Bryn K, Bjune G et al.** Production, characterization and control of MenB-vaccine "Folkehelsa": an outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease. *NIPH Ann.* 1991; 14: 67-80.

¹⁹² **Laemmli UK.** Cleavage structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T⁴. *Nature* . 1970; 227: 680.

Cell (Bio-Rad Lab., Richmond, CA, EEUU). Los distintos reactivos fueron suministrados por Bio-Rad Lab. (Richmond, CA, EEUU). Como geles separadores se emplearon geles de PA al 12% (p/v) en tampón Tris-HCl 0.375M y pH 8.8, conteniendo SDS al 0,1% (p/v), persulfato amónico al 0,05% (p/v) y TEMED al 0,5% (p/v). Las muestras conteniendo 5 µg de OMVs se disolvieron 1:1 en tampón de muestra 2x (glicerol al 10% (v/v), SDS al 2% (p/v), 2-β-mercaptoetanol 0,7 M y azul de bromofenol al $1,25 \times 10^{-3}$ (v/v)) y se incubaron 10 minutos a 95 °C para provocar la solubilización y total desnaturalización de las proteínas. Las electroforesis se realizaron a un voltaje constante de 150 V durante 1 hora, tras la cual los geles se tiñeron con CBB¹⁹³.

2.6. Electroforesis unidimensional *high resolution Clear Native Electrophoresis* (1-D hrCNE)

Para la separación de los complejos de membrana externa se utilizó el sistema electroforético no desnaturalizante *high resolution Clear Native Electrophoresis* siguiendo una variación del protocolo descrito por Wittig y colaboradores¹⁷⁷.

Preparación de los geles: como soporte electroforético se emplearon minigeles de PA de 1,5 mm de grosor para el sistema Mini-Protean®3 Cell (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EEUU). Se utilizó un gel concentrador del 4% de PA y un gel separador en gradiente del 5 al 15% o del 8 al 11% PA. Los geles incluyeron además Bis-Tris 50 mM, ácido 6-aminohexanoico 500 mM, glicerol 15,3% (v/v) (sólo incluido en la solución de mayor % de PA), persulfato amónico 0,46% y TEMED 0,046% (v/v). Los

¹⁹³ **Neuhoff V, Stam R, Eibl H.** Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrilamide gels: a systematic analysis. *Electrophoresis*. 1985; 6: 427-448.

gradientes se prepararon con el sistema Bio-Rad Gradient Former[®] siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez polimerizados se guardaron a 4 °C sumergidos en una solución Bis-Tris 50 mM, ácido 6-aminohexanoico 500 mM hasta su uso, durante un máximo de tres días. El gel concentrador se aplicó el mismo día de la electroforesis.

Tampones de electroforesis: en todas las electroforesis nativas se utilizó el mismo tampón de ánodo (Bis-Tris -HCl 50 mM, pH 7.0). Para el cátodo se emplearon dos tampones, cuya única diferencia fue el detergente neutro añadido, DDM o TX100:

Tampón de cátodo DDM: Tricina 50 mM, Bis-Tris-HCl 15 mM, DOC 0,05%, DDM 0,02%, pH 7.0.

Tampón de cátodo TX100: Tricina 50 mM, Bis-Tris -HCl 15 mM, DOC 0,05%, TX100 0,05% (v/v), pH 7.0.

Preparación de la muestra: por cada carril se cargó una muestra de OMVs consistente en 20 µg de proteína total, llevados a dilución de trabajo (1 µg/µL) con H₂O_{dd}. Posteriormente se les añadió tampón de muestra para hrCNE (Bis-Tris-HCl 50 mM, ácido 6-aminohexanoico 1 M) y solución detergente (DDM 10% p/v) hasta alcanzar la concentración final de ácido 6-aminohexanoico 87 mM, Bis-Tris -HCl 4,3 mM y DDM 0,43% (ratio DDM/proteína=5). Tras una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, la mezcla se centrifugó durante 15 minutos a 100.000 *x g* y 4 °C. Antes de cargar la muestra tratada en el gel, a cada sobrenadante se le añadió 5% de Glicerol (v/v) y 0,01% de rojo Ponceau (p/v).

Condiciones electroforéticas: la electroforesis transcurrió a 4 °C y a un voltaje de 50 V la primera hora y 100 V hasta su finalización, empleando para

ello aproximadamente 6 horas. Como marcadores de peso molecular se utilizó el kit *High Molecular Weight Calibration* para electroforesis nativa (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Para determinar el término de la electroforesis se cargó un pocillo con marcadores de peso molecular coloreados (*BioRad Kaleidoscope Standards*). Una vez que el frente de rojo Ponceau alcanzó el final del gel, se continuó con la electroforesis hasta que el frente formado por los marcadores Kaleidoscope también lo hicieron. Los geles se fijaron con ácido tricloroacético (TCA) 12% y se tiñeron con CBB.

2.7. Electroforesis bidimensional nativa/desnaturalizante (2-D hrCNE/SDS-PAGE)

Para la realización de la 2-D desnaturalizante, se cortó un carril de la 1-D, utilizando como referencias el pocillo y el rojo Ponceau que marca el frente. Posteriormente se sumergió en tampón de muestra SDS (Tris-HCl 62,5 mM, SDS al 2% (p/v), 2-β-mercaptoetanol al 2,5% (v/v), glicerol al 10% (v/v), azul de bromofenol al 0,005%) durante 10 minutos a 95 °C. Tras la incubación en el tampón de muestra, la tira se colocó horizontalmente sobre un minigel para SDS-PAGE con un 12% de PA en el gel separador y un 4% en el concentrador, moldeado este último con un peine ciego para la acomodación de la tira. Ésta se colocó de tal forma que todo el largo de la tira estuviese en contacto con el concentrador, evitando atrapar burbujas de aire entre ambos. La SDS-PAGE se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos estándar¹⁹². Finalizada la electroforesis, los geles se fijaron con TCA 12% y se tiñeron con CBB.

2.8. Electroforesis bidimensional nativa/nativa (2-D hrCNE/hrCNE)

Para la realización de la electroforesis 2-D hrCNE/hrCNE se colocó una tira de gel de la 1-D, cortada como se explica en el punto anterior, sobre otro gel de las mismas características (separador: 5-15% o 8-11% de PA, concentrador: 4% de PA, 1,5 mm de grosor). De los dos tampones de cátodo (tampón DDM y tampón TX100) en la 2-D se utilizó el que no se usó en la 1-D, es decir, si en la 1-D se empleó DDM, para la 2-D se usó el TX100 y viceversa. En lugar de marcadores de peso molecular se cargaron 20 µg de OMVs tratadas como se explica en apartado preparación de la muestra (apartado 2.6). En la sección de resultados nos referiremos a este carril como “carril de referencia”. Finalizada la electroforesis, los geles se fijaron con TCA 12% y se tiñeron con CBB.

2.9. Análisis informático de las imágenes de geles

Los geles se escanearon utilizando el Bio-Rad GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EEUU), a una resolución de 1 200 dpi. Para el análisis de las imágenes se utilizaron los programas PDQuest[®] versión 7.4.0 y Quantity One[®] de Bio-Rad. El peso molecular de las proteínas y complejos proteicos se aproximaron utilizando los estándares para SDS-PAGE de Bio-Rad y los estándares de alto peso molecular de Amersham Biosciences para electroforesis nativa.

2.10. Identificación de proteínas

La identificación de los componentes de los complejos proteicos separados por 1-D hrCNE y por 2-D hrCNE/hrCNE se llevó a cabo mediante análisis nanoLC-MS/MS, realizado en el CIC bioGUNE (Parque Tecnológico de Bizkaia,

Derio, España). La identificación de las proteínas separadas por electroforesis 2-D hrCNE/SDSPAGE se realizó por MALDI-TOF, en los Servicios de Espectrometría de masas de la Universidad de Valencia y de la Universidad de Santiago de Compostela. Tanto los complejos proteicos como las proteínas individuales se tomaron cortando las bandas y puntos correspondientes a partir del gel teñido, limitándose únicamente a la zona teñida. Cada trozo de gel se sumergió en 300 μ L de agua MilliQ en un vial Eppendorf®, y se mantuvo a 4 °C hasta su análisis en un plazo menor de 7 días.

Análisis por LC-MS/MS: las bandas y puntos cortados se digirieron con tripsina y los péptidos obtenidos se desecaron por vacío. El análisis se llevó a cabo utilizando un sistema UltraPerformance LC® de nanoflujo acoplado a un espectrómetro de masas QTOF Premier (Waters/Micromass, Manchester, Reino Unido). Las muestras se cargaron en ácido fórmico (FA) al 1% (v/v). Los péptidos tripticos se desalaron en una columna Symmetry C18 (Waters) y se separaron en una columna analítica (Atlantis C18, 75 mm id610 cm, Waters) con una punta emisora ESI integrada (SilicaTips for Micromass ZSpray NanoFlow, 10 mm diameter, New Objective). Los péptidos se eluyeron a un caudal de 250 nL/min directamente desde la columna analítica hasta la punta emisora ESI, utilizando un gradiente del 0 al 30% de solvente B en 30 minutos [solvente A: FA 1% (v/v) y solvente B: 100% ACN, FA 1% (v/v)]. Los datos se adquirieron en modo adquisición de datos dependiente, en el cual el espectro completo de masas obtenido fue seguido de MS/MS. Como gas de colisión se utilizó argón.

Para la búsqueda en las bases de datos, los datos fueron procesados usando ProteinLynx Global Server v2.2.5. (Waters). La base de datos utilizada fue Swiss-Prot v52, utilizando como motor de búsqueda MASCOT (versión 2.2.03., Matriz Sciences, London, Reino Unido). Como modificación fija se eligió la carbamidometilación y como modificación variable la oxidación. Se permitió un

solo lugar de rotura perdido, y una desviación de masa de 20 ppm y 0,1 Da por fragmento.

Análisis por MALDI-TOF: el analizador utilizado fue un espectómetro Reflex IV MALDI-TOF-MS (Bruker). Los programas informáticos utilizados para el control del equipo y la evaluación de los espectros generados fueron FlexControl 2.4 y FlexAnalysis 2.4 (Bruker), respectivamente. Los puntos cortados del gel se digirieron con tripsina para posteriormente cargar 0,5 µL de muestra en una placa AnchorChip MTP384-600 (Bruker) y ser cubiertos con 0,5 µL de una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico. En la adquisición de datos, la lista de picos se generó a partir de un mínimo de 200 disparos de láser.

Para la búsqueda en las bases de datos se utilizó MASCOT v. 2.2.06 como motor de búsqueda. La tolerancia en la desviación de la masa de los péptidos fue 50-100 ppm. Las bases de datos utilizadas para la identificación de las proteínas fueron MSDB y Swiss-Prot.

3. RESULTADOS

3.1. Análisis electroforético 1-D hrCNE

Con el fin de analizar el complexoma de membrana externa de *Neisseria meningitidis*, los complejos proteicos presentes en vesículas de membrana externa fueron separados por electroforesis nativa hrCNE, empleando como modelo la cepa H44/76.

En la **figura 7** se muestran los perfiles de bandas obtenidos con los tampones de cátodo descritos (tampón DDM, que incluye el detergente aniónico DOC y el detergente neutro DDM, y el tampón TX100, en el que se sustituye el DDM por TX100). Ambos perfiles mostraron diferencias significativas en cuanto al número y posición de las bandas, donde únicamente 3 (denominadas en la figura como bandas D1, D2 y D3 en el perfil obtenido con DDM, y como T1, T2 y T3 en el obtenido con TX100) mostraron el mismo peso molecular, independientemente de la combinación de detergentes presente en el tampón de cátodo. Estas 3 bandas mostraron un peso molecular de 740, 540 y 470 kDa respectivamente. Otras siete bandas relevantes (D4 a D10 y T4 a T10) mostraron una movilidad diferente en función del tampón de cátodo utilizado, alcanzando unos pesos moleculares de entre 220 y 140 kDa cuando se utilizó el tampón DDM, y de entre 470 y 230 kDa cuando se utilizó TX100. Además, en ambos casos, también se observó un número variable de bandas de menor peso molecular, algunas de ellas relevantes y bien definidas como las bandas D11, D12, T11, T12, T13, T14 y T15.

3.2. Análisis electroforético 2-D hrCNE/hrCNE

Con el propósito de resolver posibles co-migraciones de complejos proteicos y determinar qué complejos proteicos forman las principales bandas detectadas

en las primeras dimensiones obtenidas, las OMVs se sometieron a un análisis electroforético bidimensional nativo/nativo en el que se realizaron secuencialmente dos electroforesis hrCNE, utilizando alternativamente los tampones de cátodo DDM y TX100 tal y como se describe en el apartado de material y métodos 2.8. La **figura 8** muestra los mapas bidimensionales obtenidos con las dos secuencias de tampones, DDM en la primera dimensión y TX100 en la segunda dimensión (**figura 8, imagen i**) y viceversa (**figura 8, imagen ii**).

Figura 7. Perfil electroforético de la 1-D hrCNE de OMVs de la cepa H44/76 obtenidos con los detergentes DDM o TX100 incluidos en el tampón de cátodo. A la derecha de cada perfil se muestra el peso molecular de las principales bandas, detectadas según su densidad óptica con el programa informático QuantityOne.

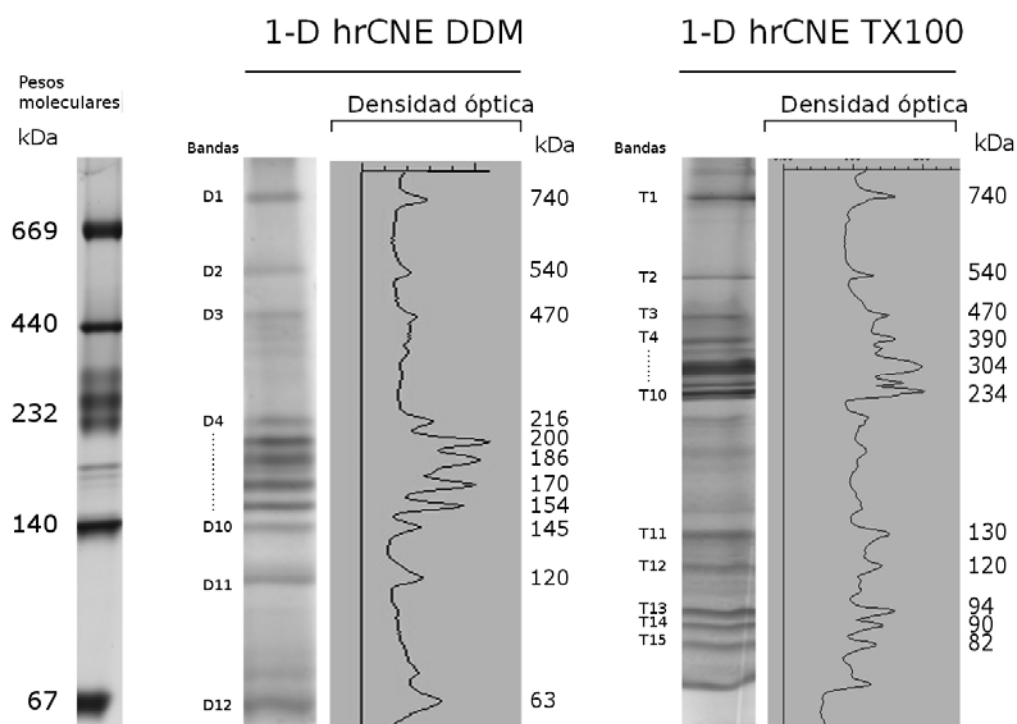
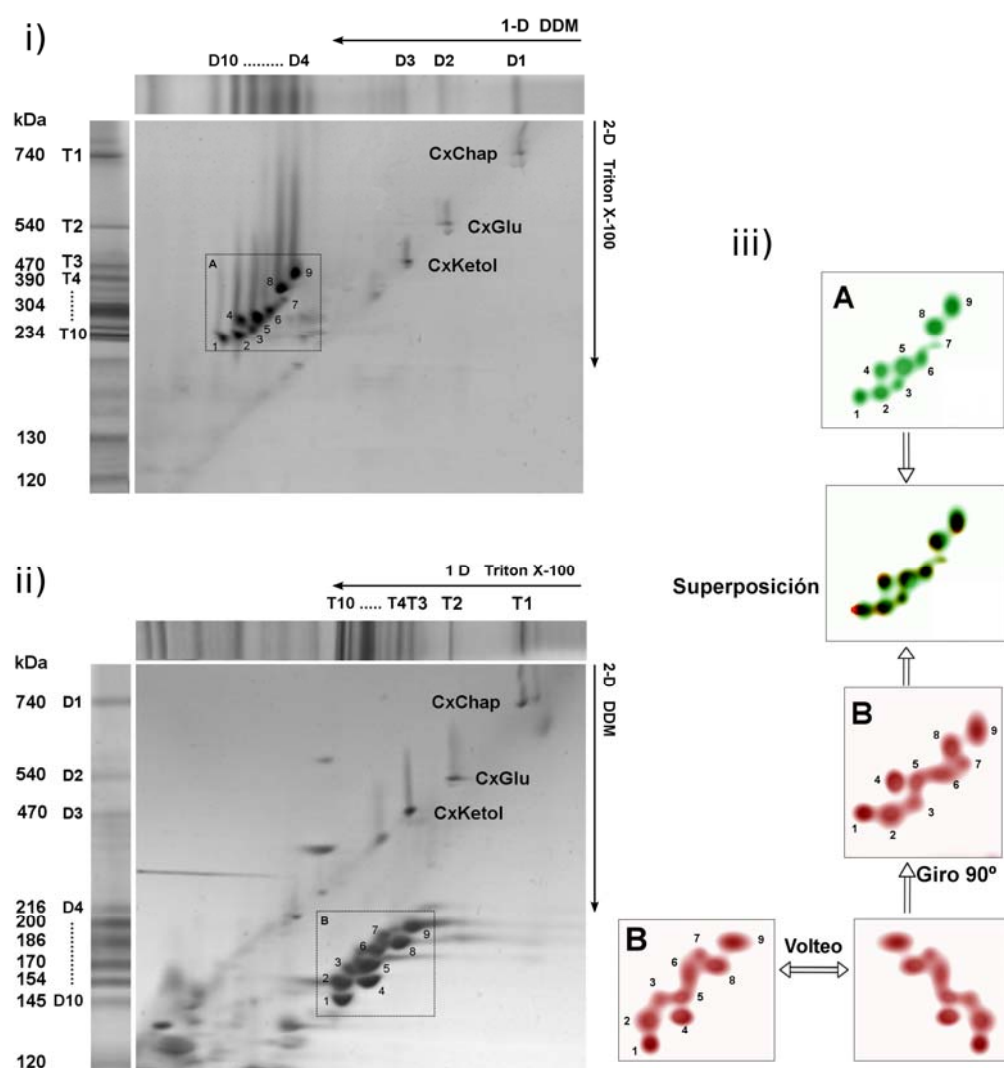


Figura 8. Análisis hrCNE/hrCNE de OMVs meningocócicas utilizando DDM en el tampón de cátodo para la separación nativa de complejos en la primera dimensión, y Triton X-100 en la segunda (imagen i) y viceversa (imagen ii). Los recuadros de la derecha (A y B) muestran la representación Gaussiana de los principales complejos de porinas, obtenidas por tratamiento de imágenes y coloreadas de verde y rojo respectivamente. La imagen B fue volteada horizontalmente y girada 90° en el sentido de las agujas del reloj para posteriormente superponer sobre la imagen A, coincidiendo en dirección y sentido la secuencia de detergentes utilizada en la separación de los complejos. Las regiones superpuestas aparecen en negro mientras que las no coincidentes mantienen su color original. Los números corresponden a los complejos Cx1 a Cx9 de la tabla 6. D1 a D10 y T1 a T10 designan las principales bandas detectadas en la 1-D hrCNE utilizando DDM o Triton X-100, respectivamente.



En cada uno de los mapas bidimensionales representados, cada punto corresponde a un complejo proteico aislado. En las composiciones **i** e **ii** de la **figura 8**, se dispuso, a modo de ejes de coordenadas, la imagen de la correspondiente primera dimensión en la parte superior de los geles (eje X), y a la izquierda una imagen de la 1-D obtenida con el segundo tampón (eje Y), para así poder determinar en qué banda de cada una de las 1-D se sitúan los diferentes complejos analizados. Por ejemplo, en la **figura 8i**, se muestra el mapa bidimensional obtenido empleando DDM en la 1-D y TX100 en la 2-D. En la parte superior se colocó la imagen de una 1-D obtenida con DDM (homóloga a la utilizada para obtener dicha 2-D), y a la izquierda la imagen de una 1-D obtenida con TX100. Por lo explicado anteriormente, el punto denominado CxChap estaría presente en la banda D1 de la 1-D con DDM y en la banda T1 de la 1-D con TX100. En la **tabla 6** se indican las bandas en las que se sitúan los complejos CxChap, CxGlu, CxKet, Cx1, Cx2, Cx3, Cx4, Cx5, Cx6, Cx7, Cx8 y Cx9 en ambas primeras dimensiones.

En los dos mapas bidimensionales los puntos observados se agrupan en dos categorías, aquellos cuya movilidad electroforética no dependió del tipo de detergentes presentes en los tampones de cátodo utilizados, reconocibles en el gel por aparecer alineados dibujando una línea diagonal, y aquellos cuya movilidad electroforética sí varió en función del tampón de cátodo, situados por encima o por debajo de dicha diagonal como resultado de una menor o mayor movilidad otorgada por el segundo tampón. Los complejos denominados CxChap, CxGlu y CxKetol se detectaron en ambos geles bidimensionales en la diagonal, mientras que los complejos de porinas Cx1 a Cx9 se situaron bien por encima de la diagonal cuando la secuencia de tampones fue DDM→TX100 (**figura 8i**) bien por debajo de la diagonal cuando la secuencia fue TX100→ DDM (**figura 8ii**).

Las imágenes digitales de las áreas recuadradas A y B (**figura 8iii**), que contienen los puntos 1, 2,...9 de ambos análisis bidimensionales fueron tratadas

aplicando una representación gaussiana de los puntos y un filtro de detección de bordes por diferencia de Gaussianas con el fin de simplificar la imagen. Los complejos separados siguiendo la secuencia de tampones DDM en la 1-D y TX100 en la 2-D, aparecen coloreados en verde (recuadro A), y los complejos separados siguiendo la secuencia inversa se muestran en color rojo (recuadro B). El recuadro B se reorientó de manera que la secuencia de tampones empleados en A y B coincidan en dirección y sentido. Ambas figuras se superpusieron y combinaron de manera que las áreas superpuestas aparezcan ennegrecidas y las no coincidentes mantengan su color original, verde o rojo. Tras dicha superposición, los 9 complejos aparecieron en color negro, confirmando que la posición relativa entre los 9 complejos es la misma en ambas electroforesis bidimensionales.

3.3. Identificación de proteínas por LC-MS/MS

Del total de puntos detectados, los denominados CxChap, CxGlu, CxKetol, Cx1, Cx2, Cx3, Cx4, Cx5, Cx6, Cx7, Cx8 y Cx9 fueron cortados del gel para su análisis por espectrometría de masas mediante nanoLC-MS/MS. Las proteínas identificadas en cada complejo se muestran en la **tabla 6**. Los complejos proteicos CxChap, CxGlu y CxKetol están formados por un único tipo de proteína, la proteína chaperonina de 60 kDa (Chap), la glutamina sintetasa (Glu) y la cetol-ácido reductoisomerasa (Ket) respectivamente. Los complejos proteicos Cx1 a Cx9 están formados por porinas en los que la proteína de clase 3 o porina PorB está presente en todos ellos, pudiendo estar acompañada por la porina PorA y la proteína de clase 4 o RmpM. De este modo los complejos Cx1 y Cx2 están formados únicamente por la proteína PorB, los complejos Cx3, Cx4, Cx5, Cx6 y Cx7 son heterómeros de PorA y PorB, y los complejos Cx8 y Cx9 formados por las proteínas PorA, PorB y RmpM.

Tabla 6. Identificación por LC-MS/MS de los componentes de los principales complejos proteicos detectados por electroforesis diagonal hrCNE/hrCNE. Los nombres de los complejos se corresponden con los utilizados en la figura 8. Las coberturas de secuencia y los códigos de identificación en las bases de datos TIGR y GenBank son los correspondientes a los genes homólogos de la cepa MC58. En las columnas 2 y 3 se muestra la correspondencia de los complejos con las bandas en las que se encuentran en el análisis 1-D hrCNE.

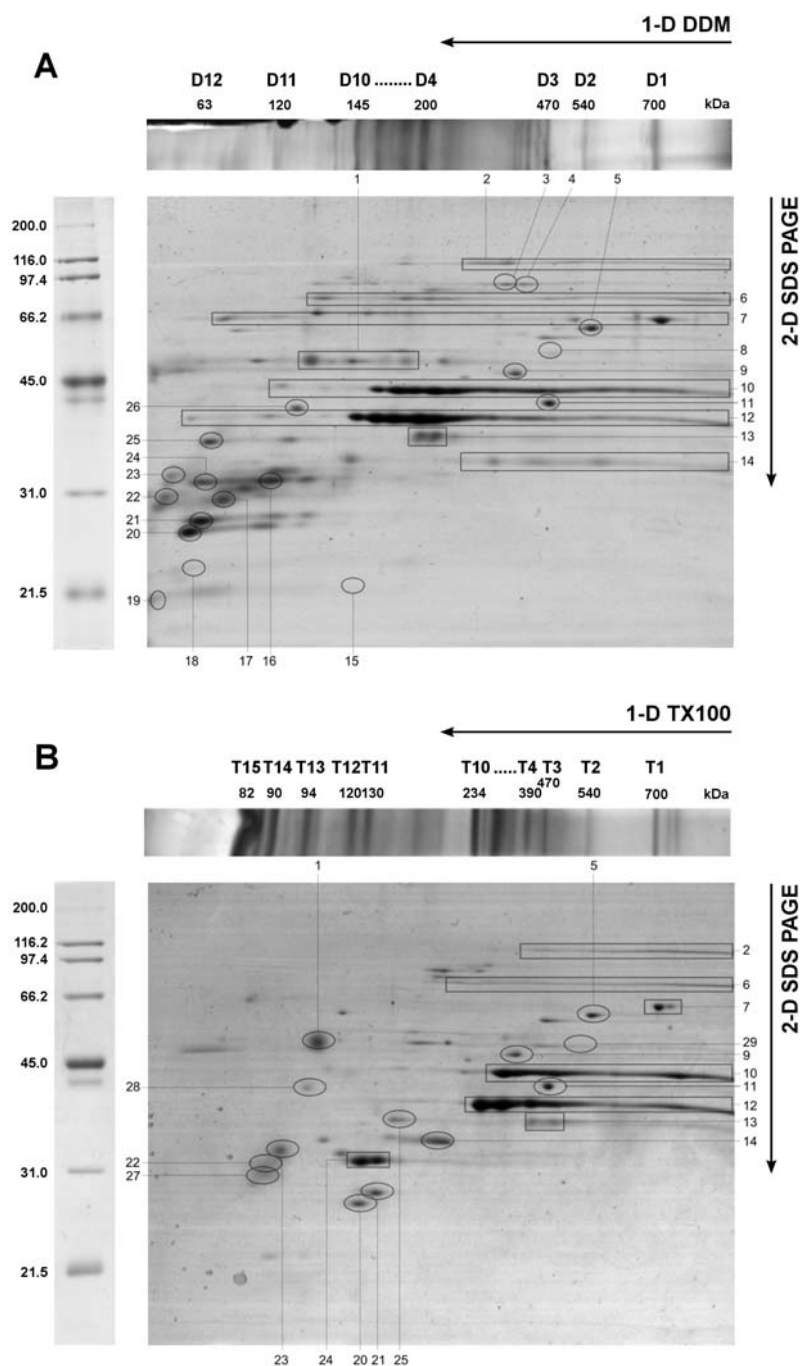
Complejo	DDM		Triton X-100		Identificación	Péptidos	Score (XC)	Score Δ CN	Cobertura de secuencia (%)	Código de identificación	
	Banda	Peso molecular (kDa)	Banda	Peso molecular (kDa)						TIGR	GenBank
CxChap	D1	740,0	T1	740,0	60 kDa chaparonin	19	5,34	0,37	35	NMB_1972	AAF42301.1
CxGlu	D2	540,0	T2	540,0	glutamine synthetase	4	3,41	0,35	9	NMB_0359	AAF40802.1
CxKet	D3	470,0	T3	470,0	ketol-acid reductoisomerase	4	5,26	0,47	34	NMB_1574	AAF41927.1
Cx1	D10	145,0	T10	390,0	PorB	24	5,27	0,36	68	NMB_2039	AAF42360.1
Cx2	D9	154,0	T10	390,0	PorB	20	5,09	0,47	76	NMB_2039	AAF42360.1
Cx3	D8	170,0	T9	360,0	PorA	3	4,70	0,55	12	NMB_1429	AAF41790.1
					PorB	16	5,51	0,48	64	NMB_2039	AAF42360.1
Cx4	D9	154,0	T8	320,0	PorA	5	4,94	0,49	18	NMB_1429	AAF41790.1
					PorB	10	4,47	0,41	39	NMB_2039	AAF42360.1
Cx5	D8	170,0	T8	320,0	PorA	12	5,46	0,48	41	NMB_1429	AAF41790.1
					PorB	15	4,60	0,46	57	NMB_2039	AAF42360.1
Cx6	D7	180,0	T7	310,0	PorA	6	4,62	0,46	22	NMB_1429	AAF41790.1
					PorB	16	4,76	0,36	50	NMB_2039	AAF42360.1
Cx7	D6	200,0	T6	300,0	PorA	11	4,36	0,45	39	NMB_1429	AAF41790.1
					PorB	13	3,99	0,42	48	NMB_2039	AAF42360.1
Cx8	D6	200,0	T5	250,0	PorA	3	4,02	0,42	11	NMB_1429	AAF41790.1
					PorB	15	4,87	0,58	48	NMB_2039	AAF42360.1
					RmpM	3	3,65	0,23	17	NMB_0382	AAF40822.1
Cx9	D5	216,0	T4	390,0	PorA	11	5,32	0,50	33	NMB_1429	AAF41790.1
					PorB	15	5,61	0,48	46	NMB_2039	AAF42360.1
					RmpM	3	2,32	0,38	12	NMB_0382	AAF40822.1

3.4. Análisis electroforético 2-D hrCNE/SDS-PAGE y MALDI-TOF

Las OMVs fueron sometidas a un análisis electroforético bidimensional desnaturalizante, en el que los complejos proteicos separados por hrCNE se sometieron a una electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE (2-D hrCNE/SDS-PAGE). Los mapas proteicos generados a partir de las primeras dimensiones obtenidas mediante hrCNE con los tampones DDM y TX100 se muestran en la **figura 9** (imágenes A y B respectivamente). Las flechas de la figura indican la dirección y sentido de migración de los complejos/proteínas en cada una de las dimensiones.

Los principales puntos de cada gel fueron cortados y analizados por espectrometría de masas mediante huella peptídica MALDI-TOF para la identificación de proteínas. En base a los resultados obtenidos a partir de cinco geles (réplicas), se analizaron un total de 151 puntos, de los cuales 80 resultaron en una identificación fiable (45 presentes en los geles 2-D obtenidos a partir de la primera dimensión con detergente DDM y 35 presentes en los geles 2-D obtenidos a partir de la primera dimensión con detergente Triton X-100).

Figura 9. Análisis electroforético 2-D hrCNE/SDS-PAGE de OMVs meningocócicas utilizando DDM (A) o Triton X-100 (B) en el tampón de cátodo para la separación nativa en la primera dimensión. Todos los puntos identificados por MALDI-TOF y reconocidos como proteínas asociadas a membrana están indicados en la figura con números y su identificación está referida a la tabla 7. Las proteínas que aparecen como múltiples puntos en una horizontal se señalan dentro de un rectángulo.



Debido a la coincidencia de muchos de los puntos entre los dos tipos geles y la presencia en múltiples puntos en una horizontal (*trails*) de algunas de las proteínas (como las porinas PorA y PorB), los 80 puntos pertenecen únicamente a 46 proteínas diferentes. De éstas, un total de 29 (marcadas en la **figura 9** y recogidas en la **tabla 7**) son proteínas cuya localización predicha es la membrana externa o periplasma, están asociadas a membrana externa o han sido detectadas repetidamente en otros estudios proteómicos de OMVs^{124,125,194,195}. A su vez, 17 de ellas se encontraron en ambos tipos de geles, 9 únicamente en geles obtenidos con DDM y 3 sólo en los geles obtenidos con Triton X-100. La **tabla 8** recoge las proteínas identificadas cuya localización, según las bases de datos públicas (SwissProt), es citoplasmática.

La electroforesis 2D hrCNE/SDS-PAGE, junto con la identificación de las proteínas, permitió la identificación de complejos proteicos y su posible composición siguiendo la regla aceptada para este tipo de geles según la cual los puntos alineados verticalmente en el gel y de similar forma son potencialmente subunidades del mismo complejo proteico. En las **figuras 10 y 11** se muestran los complejos proteicos detectados siguiendo esta metodología a partir de geles obtenidos con DDM y Triton X-100 respectivamente.

Comenzando por la **figura 10**, en el **cuadro b** se muestra la composición proteica de los complejos de porinas presentes en las bandas D4 a D10. Bajo las bandas D5, D6 se dispusieron alineadas verticalmente las proteínas PorA, PorB y RmpM, debajo de las bandas D7, D8 y D9 las proteínas PorA y PorB, y bajo la banda D10 únicamente PorB, coincidiendo con la composición de los complejos

¹⁹⁴ Ferrari G, Garaguso I, Adu-Bobie J, Doro F, Taddei AR *et al.* Outer membrane vesicles from group B *Neisseria meningitidis* Δgna33 mutant: Proteomic and immunological comparison with detergent-derived outer membrane vesicles. *Proteomics* 2006; 6: 1856-1866.

¹⁹⁵ Uli L, Castellanos-Serra L, Betancourt L, Domínguez F, Barberá R *et al.* Outer membrane vesicles of the VA-MENGOC-BC vaccine against serogroup B of *Neisseria meningitidis*: Analysis of protein components by two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2006; 6: 3389-3399.

de porinas presentes en dichas bandas según los análisis LC-MS/MS (ver **tabla 6**). Además, este análisis permitió también la detección de varios complejos proteicos de porinas de alto peso molecular (**cuadro c**), formados por al menos las proteínas PorA, PorB, RmpM y MIP (*Macrophage Infectivity Potentiator*), y el complejo del sistema de captación de hierro TbpAB, formado por las proteínas TbpA y TbpB (**cuadro a**). Los complejos de porinas de alto peso molecular y el complejo TbpA/TbpB no pudieron ser asignados a bandas concretas de la primera dimensión.

Tabla 7. Identificación por MALDI-TOF de los principales puntos detectados mediante electroforesis 2-D hrCNE/SDS-PAGE. Los puntos se corresponden con los marcados en la figura 9. En esta tabla únicamente se muestran los puntos correspondientes a proteínas descritas como proteínas de membrana o asociadas a ella. Las coberturas de secuencia, códigos de identificación en bases de datos (ID) y los pesos moleculares dados son los correspondientes a los genes/proteínas homólogos de la cepa secuenciada MC58 de *N. meningitidis*.

Punto	Identificación	Score	Cobertura de secuencia (%)	m/u*	TIGR ID**	GenBank ID**	Peso molecular (kDa)
1	Conserved hypothetical protein	83	32	10/35	NMB_0035	AAF40506.1	42,3
2	Trasferrin-binding protein A	185	30	23/25	NMB_0461	AAF40898.1	102,1
3	Trasferrin-binding protein B	58	15	10/38	NMB_0460	AAF40897.1	77,4
4	Outer membrane protein P64k	88	20	12/25	NMB_1344	AAF41719.1	61,8
5	Glutamate-ammonia ligase	135	31	14/26	NMB_0359	AAF40802.1	52,1
6	Fe-regulated protein B	281	41	27/21	NMB_1988	AAF42315.1	79,1
7	60kDa chaperonin	103	23	11/9	NMB_1972	AAF42301.1	57,4
8	Copper-containing nitrite reductase	43	20	6/25	NMB_1623	AAF41975.1	40,7
9	Glutamine synthetase	193	43	23/37	NMB_1710	AAF42057.1	48,5
10	Major outer membrane protein PorA	54	22	6/28	NMB_1429	AAF41790.1	42,1
11	Ketol-acid reductoisomerase	157	37	16/25	NMB_1574	AAF41927.1	36,4
12	Major outer membrane protein PIB	144	57	12/22	NMB_2039	AAF42360.1	35,7
13	Outer membrane protein class 4	120	45	12/33	NMB_0382	AAF40822.1	26,2
14	Macrophage infectivity potentiator	156	50	17/31	NMB_1567	AAF41921.1	28,9
15	pilS cassette	58	32	7/47	NMB_0024	-	22,3
16	Outer membrane lipoprotein	44	24	5/30	NMB_1946	AAF42275.1	31,2
17	ATP synthase F0, B subunit	75	50	7/36	NMB_1938	AAF42267.1	17,1
18	Class 5 outer membrane protein	60	27	8/53	NMB_1053	AAF41451.1	29,9
19	H.8 outer membrane protein	46	32	7/28	NMB_1533	AAF41888.1	18,5
20	Opacity protein	107	41	11/39	-	(O30756_NEIME)	27,0
21	Opacity protein	63	39	8/60	-	(O30753_NEIME)	26,3

Punto	Identificación	Score	Cobertura de secuencia (%)	m/u*	TIGR ID**	GenBank ID**	Peso molecular (kDa)
22	Thiol:disulfide interchange protein dsbA (dsbA-2)	119	45	14/36	NMB_0294	AAF40745.1	25,4
23	Outer membrane lipoprotein	53	22	5/19	NMB_1946	AAF42275.1	31,2
24	Opacity-related protein POM1	111	39	11/36	-	(OPR1_NEIMC)	28,9
25	IgA-specific metalloendopeptidase	134	49	13/30	-	(AAW89025.1)	175,9
26	Conserved hypothetical protein	74	29	11/37	NMB_1652	AAF42001.1	46,4
27	Periplasmatic s/p-binding protein	75	21	9/27	NMB_0462	AAF0899.1	44,4
28	Thiol:disulfide interchange protein dsbA (dsbA-1)	103	52	12/40	NMB_0278	AAF40732.1	25,2
29	Multidrug efflux pump channel protein	127	31	12/18	NMB_1714	AAF42061.1	50,5

* *matched/unmatched*

** Los ID omitidos indican que no existe anotación del gen homólogo de la cepa MC58 en las bases de datos públicas. Los IDs entre paréntesis corresponden a genes homólogos en cepas diferentes a la MC58 y que no están descritos en ésta.

Tabla 8. Identificación por MALDI-TOF de los puntos detectados utilizando electroforesis 2-D hrCNE/SDS-PAGE que no están descritos como proteínas asociadas a la membrana externa. Las coberturas de secuencia, los códigos de identificación en bases de datos (ID) y los pesos moleculares dados son los correspondientes a los genes/proteínas homólogos de la cepa secuenciada MC58 de *N. meningitidis*.

Identificación	Score	Cobertura de secuencia (%)	m/u*	TIGR ID**	GenBank ID**	Peso molecular (kDa)
biopolymer transport protein ExbB	48	25	7/34	NMB_1729	AAF42074.1	24,1
hypothetical protein	70	30	8/36	NMB_1870	AAF42204.1	28,9
phosphatidylserine decarboxylase precursor-related protein	63	33	8/31	NMB_0963	AAF41369.1	28,9
lacto-N-neotetraose biosynthesis glycosyltransferase	56	36	9/82	NMB_1926	AAF42255.1	32,8
integrase/recombinase XerC	45	26	8/53	NMB_1868	AAF42202.1	34,0
hypothetical protein	103	36	10/23	NMB_0086	AAF40549.1	36,8
Transposase	67	34	10/65	NMB_1399	AAF41763.1	37,3
alcohol dehydrogenase, zinc containing	104	35	11/22	NMB_0604	AAF41031.1	37,9
Glycosyltransferase	56	31	10/76	NMB_0218	AAF40674.1	42,1
lactate dehydrogenase	71	22	7/10	NMB_1377	AAF62327.1	43,1
aminopeptidase A	49	20	7/30	NMB_1569	(CAB84986)	49,7
argininosuccinate lyase	56	22	9/36	NMB_0637	AAF41060.1	51,2
IMP dehydrogenase	273	64	24/18	NMB_1201	AAF41583.1	52,4
pyruvate dehydrogenase	95	31	11/26	NMB_1342	AAF41717.1	55,2
hypothetical protein	112	33	15/28	NMB_1345	AAF41720.1	57,1
Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	100	28	17/47	NMB_0758	AAF41171.1	76,4

* *matched/unmatched*

** Los IDs entre paréntesis corresponden a genes homólogos en cepas diferentes a la MC58 y que no están descritos en ésta.

En el análisis del gel 2-D hrCNE/SDS-PAGE utilizando TX100 en la primera dimensión (**figura 11, cuadro b**) se observaron diferencias en los complejos detectados. De manera similar al gel del apartado anterior, se observaron alineadas verticalmente las proteínas PorA, PorB y RmpM bajo las bandas T4 y T5, las proteínas PorA y PorB debajo de las bandas T6, T7, T8 y T9, y únicamente PorB bajo la banda T10, coincidiendo con la composición de los complejos de porinas presentes en dichas bandas según los análisis LC-MS/MS (ver **tabla 6**). En este análisis también se detectaron complejos de porinas de alto peso molecular, aunque únicamente formados por PorA, PorB y RmpM. El complejo formado por las proteínas TbpA y TbpB tampoco fue detectado. Las bandas T11 y T12 (**figura 11, cuadro a**) correspondieron a dos complejos proteicos formados por las proteínas Opa, ambos conteniendo la proteína *Opacity Related Protein POM1*. El correspondiente a la banda T11 está formado también por la *Opacity Protein* de 27 kDa, y el complejo correspondiente a la banda T12, por la *Opacity Protein* de 26,3 kDa.

Figura 10. Análisis electroforético 2-D hrCNE/SDS-PAGE de OMVs utilizando DDM en el tampón de cátodo para la separación nativa en la primera dimensión. Los recuadros a, b y c, corresponden a zonas ampliadas del gel superior, que incluyen los componentes proteicos de los complejos separados en la 1-D donde las proteínas situadas en la vertical (líneas de puntos) desde la posición inicial del complejo, son potencialmente subunidades de dicho complejo.

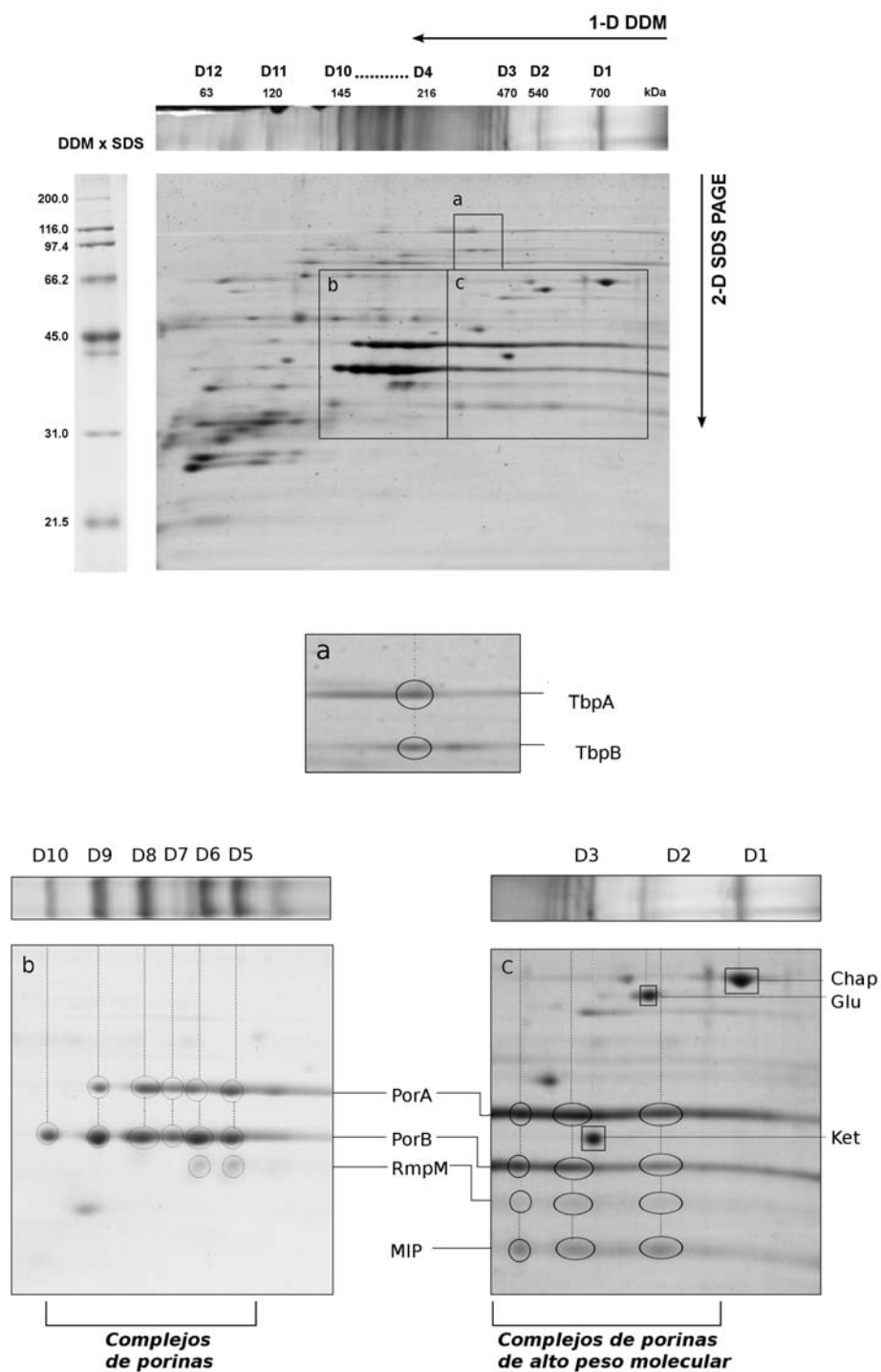
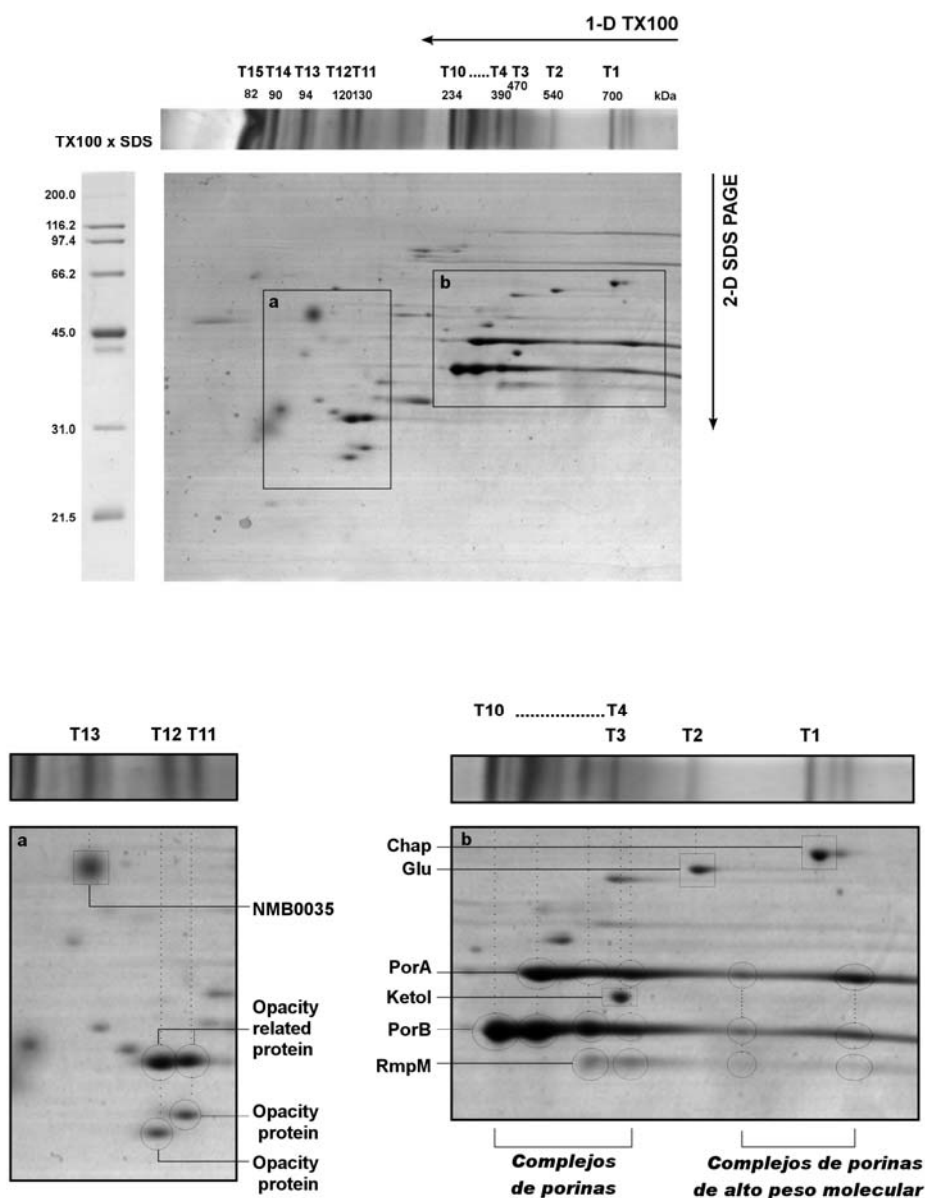


Figura 11. Análisis electroforético 2-D hrCNE/SDS-PAGE de OMVs utilizando TX100 en el tampón de cátodo para la separación nativa en la primera dimensión. Los recuadros a y b corresponden a zonas ampliadas del gel superior, que incluyen los componentes proteicos de los complejos separados en la 1-D donde las proteínas situadas en la vertical (líneas de puntos) desde la posición inicial del complejo, son potencialmente subunidades de dicho complejo.



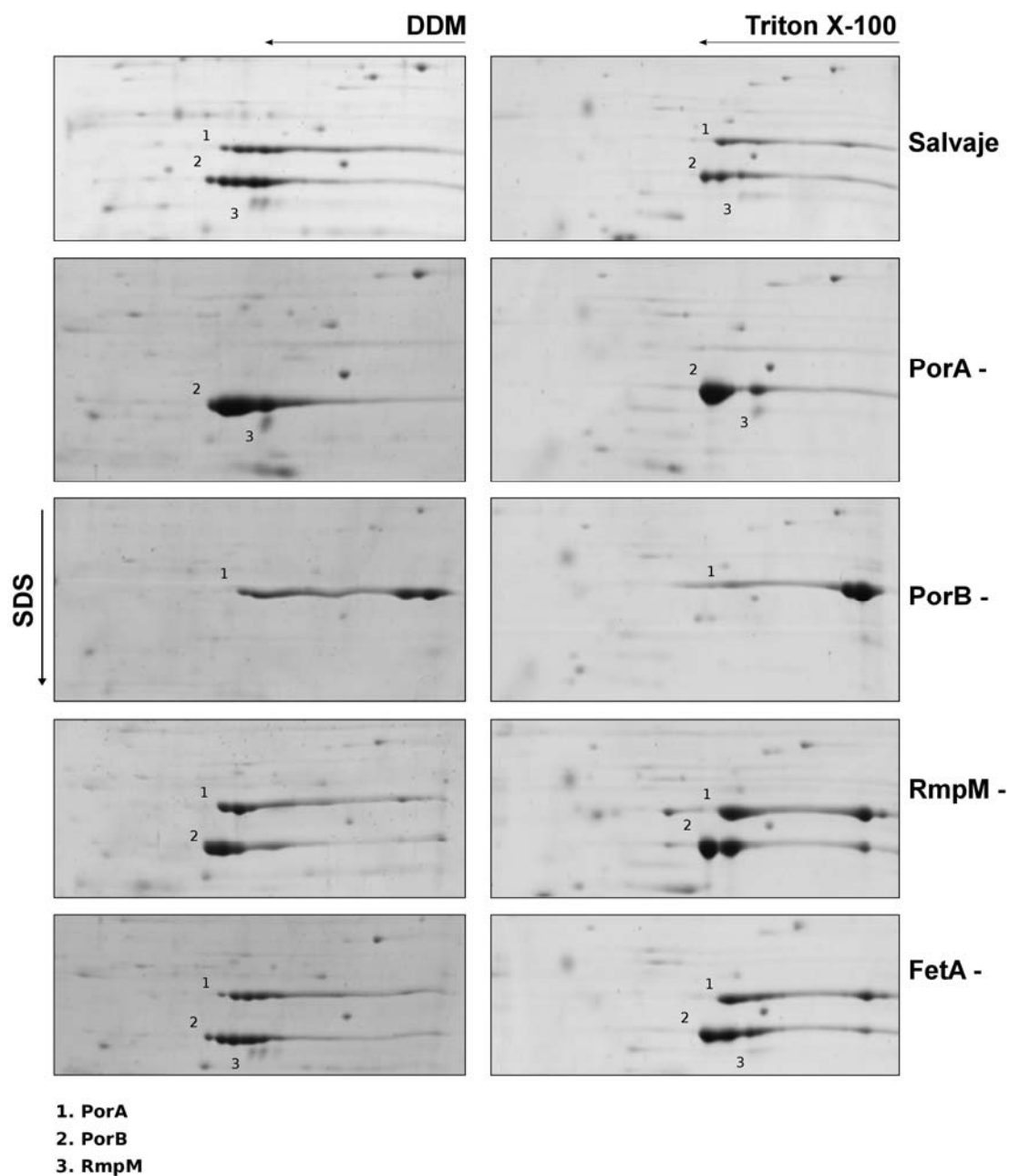
3.5. Caracterización de complejos proteicos de las cepas mutantes PorA⁻, PorB⁻, RmpM⁻ y FetA⁻

La colaboración con otros grupos de investigación nos ha permitido disponer de cepas mutantes defectivas en las proteínas PorA, PorB, RmpM y FetA. Los estudios de los complejos proteicos de la membrana externa de estas cepas ofreció una valiosa información acerca de los complejos proteicos en los que participan las proteínas defectivas en cada mutante por comparación con la cepa homóloga salvaje H44/76. Con este fin, los complejos proteicos y proteínas presentes en OMVs de las cepas mutantes fueron sometidas a electroforesis 2-D hrCNE/SDS-PAGE, mostrando los resultados en la **figura 12**.

Los complejos proteicos CxChap, CxGlu y CxKet no mostraron variación en su tamaño molecular en ninguna de las cuatro cepas mutantes, manteniendo su peso molecular observado de 740, 540 y 470 kDa respectivamente. Con la excepción de la cepa FetA⁻, cuyo mapa 2-D hrCNE/SDS-PAGE no mostró diferencias con el de la cepa salvaje, los mapas generados por las OMVs mutantes PorA⁻, PorB⁻ y RmpM mostraron importantes diferencia entre sí y respecto al de la cepa salvaje.

El mutante PorA⁻ mostró un aumento en la intensidad de los puntos correspondientes a los complejos homoméricos de PorB. En el mapa 2-D hrCNE/SDS-PAGE a partir de DDM, el número de complejos proteicos con RmpM se reduce a uno, tanto en los geles tratados con DDM en la 1-D como en los tratados con TX100, que estaría formado por PorB y RmpM. Los complejos proteicos de porinas de alto peso molecular resultaron menos evidentes o inexistentes.

Figura 12. Análisis electroforético 2-D hrCNE/SDS-PAGE de OMVs de la cepa salvaje H44/76 y las cepas mutantes knock-out defectivas en las proteínas PorA, PorB, RmpM o FetA. Los análisis del panel de la izquierda se realizaron empleando DDM en el tampón de cátodo para la separación nativa de los complejos en la primera dimensión. Los situados en el panel de la izquierda fueron realizados utilizando Triton X-100. Únicamente se muestran las regiones conteniendo los componentes de los complejos de porinas.



El mutante PorB- resultó ser el mutante que más diferencias presentó respecto a la cepa salvaje. A pesar de que la PorA se encontró bajo la región correspondiente a los complejos de porinas de la cepa salvaje, la gran mayoría de PorA se situó formando dos complejos de alto peso molecular, entorno a los 700 kDa, tanto en las 2-D resultantes tras la 1-D con DDM como con TX100.

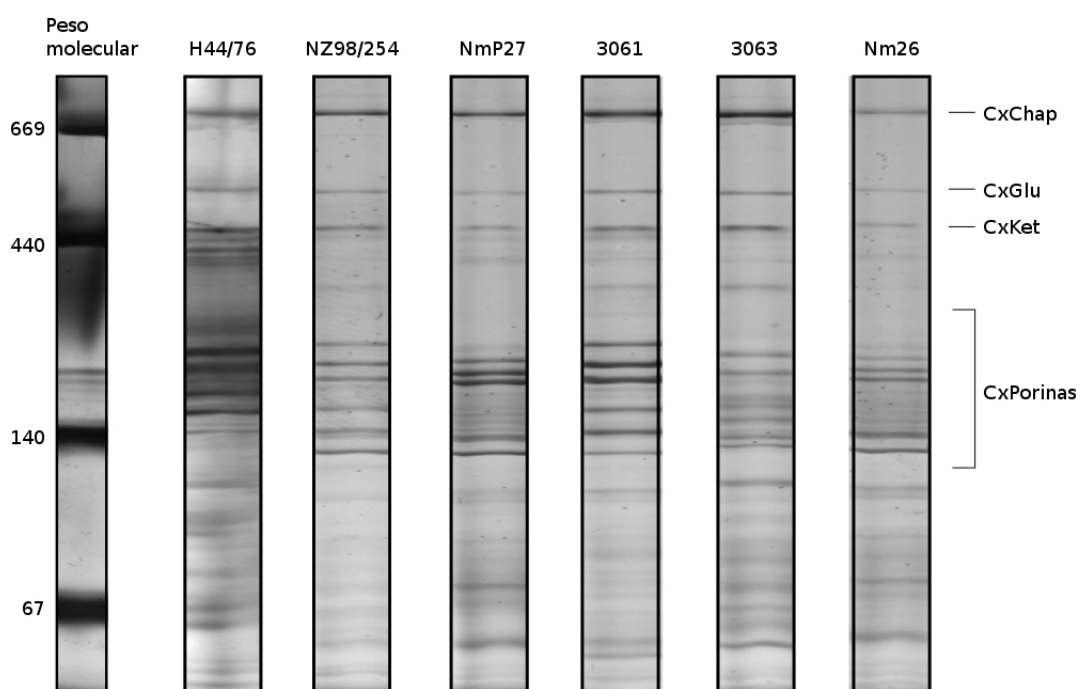
El mutante RmpM- mostró un aumento de la intensidad de los puntos correspondientes a los complejos homoméricos de PorB y heteroméricos PorA/PorB, no detectándose ni PorA, ni PorB bajo la posición correspondiente a los heterómeros PorA/PorB/RmpM de la cepa salvaje.

3.6. Caracterización de complejos proteicos en cepas heterólogas

Tras el análisis cualitativo de los complejos proteicos de membrana de la cepa H44/76, se sometieron a análisis electroforético las OMVs de las cepas heterólogas NZ98/254, 3061, 3063, Nm26 y NmP27, prestando una especial atención a los complejos de porinas. Para ello, los complejos proteicos presentes en las OMVs de dichas cepas se analizaron por electroforesis nativa 1-D hrCNE y por electroforesis 2D hrCNE/hrCNE y 2-D hrCNE/SDS-PAGE.

En la **figura 13** se comparan los perfiles electroforéticos obtenidos con las OMVs de las cepas mencionadas mediante hrCNE, utilizando el tampón de cátodo conteniendo DDM. Todos los perfiles mostrados proceden del mismo gel de poliacrilamida. Los complejos CxChap, CxGlu y CxKet se detectaron en la seis cepas heterólogas, sin existir ninguna diferencia significativa en su movilidad electroforética, tal y como indica la perfecta coincidencia en su peso molecular.

Figura 13. Análisis electroforético 1-D hrCNE, con DDM en el tampón de cátodo, de OMVs de la cepa modelo H44/76 y 5 cepas heterólogas.

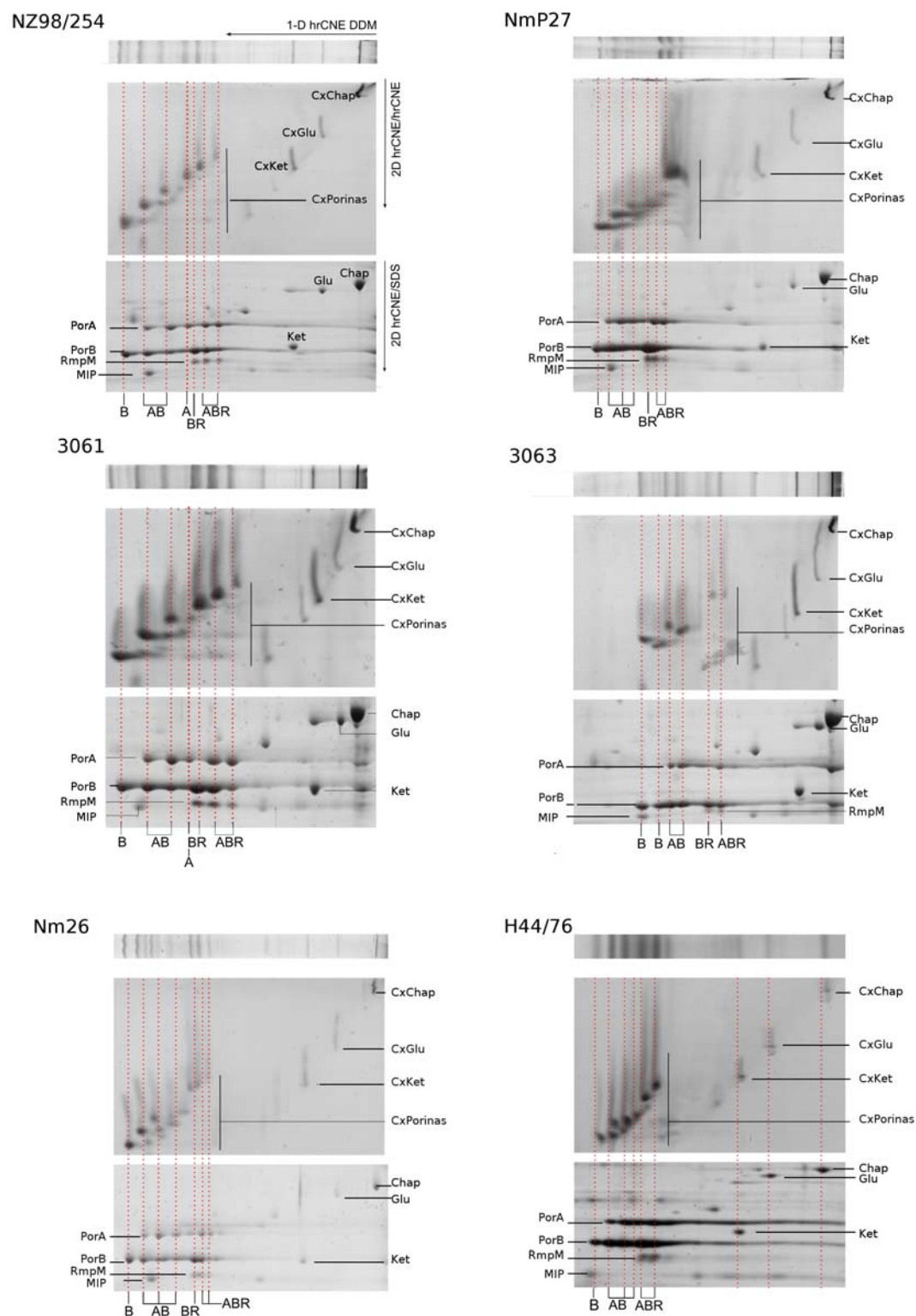


Los complejos de porinas sí mostraron diferencias en cuanto al número y posición de bandas, si bien todas se detectaron dentro del rango de peso molecular de 130 a 250 kDa.

A partir de las primeras dimensiones obtenidas se realizó una segunda dimensión nativa, en la que se empleó el tampón de cátodo con el detergente TX100, para resolver los posibles complejos co-migrantes, y una segunda dimensión desnaturizante nativa mediante SDS-PAGE para estudiar la composición proteica de los complejos presentes en las bandas detectadas, tal y como se hizo con la cepa H44/76. En la **figura 14** se muestra una composición de imágenes correspondientes a esta secuencia de electroforesis realizadas con cada una de las cepas heterólogas. Las imágenes de los geles están dispuestas de tal modo que en la línea vertical que desciende desde cada una de las bandas de la 1-D hrCNE se sitúan los complejos que forman dicha banda (2-D hrCNE/hrCNE), y las proteínas individuales que componen dichos complejos (2-D hrCNE/SDS-PAGE).

Los mapas obtenidos con cada cepa fueron muy similares a los de la cepa modelo H44/76. Tras la electroforesis 2-D hrCNE/hrCNE en todas las cepas, los complejos CxChap, CxGlu y CxKet se situaron en la diagonal dibujada por las proteínas complejos con igual movilidad en ambos tampones, del mismo modo que en la cepa H44/76. Por su parte, los complejos de porinas se situaron por encima de la diagonal, como ocurre con la cepa modelo con esta secuencia de tampones. El número de complejos de porinas varió en cuanto a número aunque su composición proteica, como muestra la segunda dimensión desnaturizante, fue similar presentando en todas ellas complejos formados por PorB, PorA/PorB, y PorA/PorB/RmpM (en la figura indicados como B, AB, y ABR, respectivamente). Además, también se encontraron asociaciones homoméricas de PorA y heterómeros PorB/RmpM (indicados como A y BR).

Figura 14. Análisis de los principales complejos proteicos de membrana externa de la cepa H44/76 y las cinco cepas heterólogas mediante la primera dimensión nativa, la segunda dimensión nativa y la segunda dimensión desnaturizante (en la figura indicadas como: 1-D hrCNE DDM, 2-D hrCNE/hrCNE, 2-D hrCNE/SDS, respectivamente).



Las cepas NZ98/254, 3061, Nm26 y NmP27 fueron las que mostraron una mayor similitud a la cepa modelo. La composición proteica de los complejos de porinas se dedujo a partir de la bidimensional desnaturalizante, existiendo 5 tipos de asociaciones entre los componentes de los poros de porinas estudiados en la cepa H44/76. Estas combinaciones son, de menor a mayor peso molecular, homómeros de PorB y heterómeros de PorA/PorB, homómeros de PoaA, y heterómeros de PorB/RmpM y PorA/PorB/RmpM. Debido a baja cantidad de los homómeros de PorA y su similar tamaño con los complejos PorB/RmpM, los homómeros de PorA solo se detectaron claramente en las cepas NZ98/254 y 3061. La cepa 3063 presentó 6 complejos de porinas en los que su composición es muy similar a las anteriores, homómeros de PorB y heterómeros de PorA/PorB, de PorB/RmpM y PorA/PorB/RmpM. En las cinco cepas heterólogas se detectó un único punto bajo los complejos CxChap, CxGlu y CxKet correspondientes a las proteínas que componen dichos complejos: chaperonina, glutamina sintetasa y cetol-ácido reductoisomerasa. La proteína MIP fue detectada en las 5 cepas heterólogas (NZ98/254, 3061, 3063, Nm26 y NmP27), y su asociación a complejos de porinas de alto peso molecular no se pudo concluir debido a la similitud en tamaño de la RmpM.

4. DISCUSIÓN

Los trabajos publicados con anterioridad sobre complejos proteicos de *N. meningitidis* se han centrado en complejos proteicos específicos, como los pili³⁶, receptores de proteínas transportadoras de hierro^{156,159}, síntesis de membrana¹⁹⁶ o complejos de porinas^{135,139,197,198}. Estos estudios se han realizado con técnicas electroforéticas desnaturalizantes adaptadas al estudio de complejos, como la SDS-PAGE con bajo contenido de SDS o con solubilización de las proteínas a baja temperatura, y mediante la utilización de cepas mutantes.

En el caso de los complejos de porinas, la mayoría de los estudios sobre estructura y función se han llevado a cabo utilizando bien porinas recombinantes (rPorA o rPorB) insertadas en membranas lipídicas artificiales^{141,197} o bien porinas purificadas de cepas mutantes deficientes en una de las dos porinas¹⁹⁸. En base a estos estudios, junto con la similitud a porinas de otras bacterias Gram-negativas, se ha asumido que existen en la membrana externa como homotrímeros, tanto de PorA como de PorB. Los consiguientes trabajos de funcionalidad han sido realizados en base a esta asunción. Sin embargo, existen otras evidencias que sugieren que las porinas meningocócicas también se asocian normalmente como heterotrímeros. En trabajos previos en nuestro laboratorio, se analizó el complexoma de las vesículas de membrana externa utilizando las técnicas electroforéticas SDS-PAGE diagonal¹⁹⁹ y BNE²⁰⁰, que permitieron

¹⁹⁶ Volokhina EB, Beckers F, Tommassen J, Bos MP. The beta-barrel outer membrane protein assembly complex of *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol.* 2009; 191: 7074-7085

¹⁹⁷ Jansen C, Wiese A, Reubsact L, Dekker N, de Cock H *et al.* Biochemical and biophysical characterization of in vitro folded outer membrane porin PorA of *Neisseria meningitidis*. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1464: 284-298.

¹⁹⁸ Massari P, King CA, MacLeod H, Wetzler LM. Improved purification of native meningococcal porin PorB and studies on its structure/function. *Protein Expr Purif.* 2005; 44: 136-146.

¹⁹⁹ Sánchez S, Arenas J, Abel A, Criado MT, Ferreirós CM. Analysis of outer membrane protein complexes and heat-modifiable proteins in *Neisseria* strains using two-dimensional diagonal electrophoresis. *J Proteome Res.* 2005; 4: 91-95.

analizar varios complejos proteicos. En el estudio usando la SDS-PAGE diagonal, se detectaron dos complejos de porinas, denominados C4 y C5, constituidos por las proteínas PorA/PorB/RmpM. La técnica utilizada, SDS-PAGE diagonal, emplea como agente de solubilización el detergente iónico SDS, con lo que, a pesar de que los ensayos se realizaron a temperatura ambiente, baja concentración de SDS y condiciones no reductoras, es posible que algunos complejos se desestabilizaran resultando no detectables. Posteriormente, con la aplicación de la BNE para la separación de los complejos en una primera dimensión y la aplicación de una 2-D desnaturalizante en SDS-PAGE se detectaron seis complejos en la primera dimensión nativa; sin embargo, la baja resolución de la segunda dimensión en SDS impidió poder asignar qué proteínas formaban cada uno de los complejos detectados en la 1-D²⁰⁰.

En este trabajo para la separación de complejos proteicos hemos utilizado una técnica recientemente publicada, la *high resolution Clear Native Electrophoresis*¹⁷⁷. Las OMVs conseguidas para este estudio fueron obtenidas en cultivos bajo condiciones de restricción de hierro para inducir la expresión de proteínas de captación de hierro. Para minimizar aquellas condiciones que pudiesen alterar la conformación nativa de los complejos proteicos presentes en la OMVs, el método utilizado para la obtención de las OMVs fue la Prensa de French. El protocolo más utilizado para la extracción de OMVs y con el que se obtiene las OMVs de vacunas es la extracción con deoxicolato sódico; sin embargo, análisis previos hechos en nuestro laboratorio demostraron que la extracción con Prensa de French conlleva una menor contaminación de proteínas citoplasmáticas y una menor pérdida de lipoproteínas asociadas a membrana externa²⁰⁰, siendo similar a las OMVs nativas producidas por la célula durante su

²⁰⁰ Marzoo J, Abel A, Sánchez S, Chan H, Feavers I *et al.* Analysis of outer membrane porin complexes of *Neisseria meningitidis* in wild-type and specific knock-out mutant strains. *Proteomics*. 2009; 9: 648-656.

crecimiento y resultando, por lo tanto, más apropiada para el estudio que en este trabajo se trata.

La electroforesis hrCNE resultó ser una potente herramienta para el estudio de complejos proteicos, especialmente cuando se aplica para la obtención de mapas bidimensionales, debido a su gran enfoque y versatilidad. Una de las principales ventajas del análisis del complexoma mediante un sistema electroforético nativo fue la posibilidad de aislar numerosos complejos proteicos en un solo experimento para su posterior caracterización. Dado que los complejos proteicos presentan diferente susceptibilidad a la desestabilización por detergentes¹⁶⁸, incluso siendo éstos no desnaturalizantes, se optó por utilizar dos tampones de cátodo que incluyen detergentes neutros diferentes para la realización de las primeras dimensiones hrCNE, y así formar, junto con el detergente aniónico DOC común a ambos, dos tipos de las micelas mixtas. La robustez de la técnica permitió la utilización de ambos detergentes complementando los resultados obtenidos.

Los perfiles electroforéticos obtenidos en las 1-D incluyeron numerosas bandas dentro del rango de 67 a 700 kDa que, *a priori*, corresponderían a complejos proteicos. Sólo las bandas correspondientes a los complejos CxChap, CxGlu y CxKet fueron comunes a ambos perfiles. Una desventaja del análisis electroforético unidimensional es la posible co-migración de varias proteínas/complejos proteicos en la misma banda²⁰¹, por lo que es necesaria la utilización de técnicas complementarias a la 1-D para conseguir una mayor separación de los complejos. Aprovechando las diferencias generadas con la utilización de dos mezclas de detergentes, la 2-D hrCNE/hrCNE permitió una mejor separación de los complejos proteicos presentes en las dos primeras

²⁰¹ **Krause F.** Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. *Electrophoresis*. 2006; 27: 2759-2781.

dimensiones, haciendo así posible un análisis por LC-MS/MS más fiable al eliminar las co-migraciones de complejos existentes.

Los complejos CxChap, CxGlu y CxKet aparecieron alineados en una diagonal como resultado de una movilidad electroforética independiente de las condiciones de solubilización. Las proteínas que forman estos complejos son solubles en agua, tal y como indica su localización citosólica predicha, localización que será discutida más adelante. El carácter hidrofílico de estos complejos implica una independencia por detergentes para su solubilización, por lo que su migración hacia el ánodo podría depender únicamente de su carga neta intrínseca, con lo que la distancia recorrida en el gel en ambas dimensiones es la misma.

Por el contrario, los complejos de porinas sí mostraron una movilidad diferencial en función de las condiciones de solubilización. En un primer momento, el hecho de que los complejos de porinas separados con TX100 migrasen hasta pesos moleculares entorno a los 300-400 kDa, y que cuando la separación se realizaba con DDM migrasen hasta los 150-200 kDa, parecía indicar que la solubilización con TX100 respetaba un estado de asociación mayor, a modo de supercomplejos, los cuales eran desestabilizados en subcomplejos de menor tamaño en presencia del tampón DDM. Sin embargo, esta explicación fue descartada por el hecho de que en la 2D hrCNE/hrCNE con la secuencia de detergentes DDM/TX100, los supuestos subcomplejos separados con DDM en la primera dimensión, volvían a migrar hasta los 300-400 kDa con TX100 en la segunda. Las porinas son proteínas integrales de membrana y como tal presentan carácter altamente hidrofóbico, por lo que en solución acuosa tienden a autoagregarse o insertarse en ambientes hidrofóbicos como membranas lipídicas o micelas de detergentes. En consecuencia, las proteínas o complejos hidrofóbicos, son solubilizados por inclusión en micelas, y migrarán hacia el ánodo gracias a la carga neta negativa de ésta. Las mezclas de detergentes

presentes en los dos tampones utilizados, DOC+DDM y DOC+TX100, generan micelas mixtas en las que las diferencias estructurales entre el DDM y TX100, podría implicar diferencias en el tamaño entre ambos tipos de micelas, deteniendo la migración de los complejos solubilizados a diferentes tamaños de poro en el gel de poliacrilamida. Esto explicaría así las diferencias de tamaño observadas entre los complejos de porinas en función del detergente utilizado en el tampón de cátodo.

La composición de los complejos de porinas, deducido a partir de los datos de espectrometría de masas y del análisis electroforético, sería principalmente de homómeros de PorB, heterómeros de PorA/PorB acompañados o no de RmpM, y heterómeros PorA/PorB/RmpM/MIP. Sin embargo, el análisis electroforético de las demás cepas reveló también la existencia de heterómeros de PorB/RmpM y, en menor medida, homómeros de PorA. Posiblemente estas asociaciones también estén presentes en la cepa H44/76 aunque los análisis no permitieron confirmarlo. La asociación de PorA es coherente debido a que el mutante PorB- muestra complejos de PorA de tamaño similar a los de porinas, si bien la gran mayoría de la porina PorA se socia formando un agregado de aproximadamente 800 kDa. Probablemente PorB/RmpM también esté presente en el complejo Cx8 de la cepa modelo H44/76, aunque es posible que, debido a contaminación con PorA de complejos vecinos y a la alta sensibilidad de LC-MS/MS, ésta se identifique como participante del complejo PorB/RmpM.

Varios de los complejos de porinas, a pesar de mostrar la misma composición proteica, mostraron una diferente movilidad electroforética en la primera dimensión con DDM. Los complejos Cx1 y Cx2 formados ambos por PorB se encuentran en las bandas D10 y D9. Del mismo modo, los complejos Cx3, Cx4, Cx5 y Cx6, compuestos por PorB y PorA aparecen en las bandas D8, D6 y D5, y los complejos Cx8 y Cx9 compuestos por PorA/PorB/RmpM en las bandas D5 y D4. Estas diferencias de movilidad entre complejos de igual composición podrían

ser debidas a diferencias estequiométricas. Dado que PorA y PorB presentan distinto tamaño molecular (43 y 38-42 kDa respectivamente), y asumiendo el modelo aceptado de poros triméricos, su asociación heteromérica permite diferentes estequiometrias generando distintos tamaños moleculares, al margen de la participación de la RmpM, de la que se desconoce el número de unidades asociadas por complejo. De hecho, la formación de complejos de porinas con porinas recombinantes por inclusión en liposomas que actualmente se está realizando en nuestro laboratorio, permitió observar la formación de dos tipos de heterotrímeros de PorA/PorB, uno con dos subunidades de PorA y una de PorB y otro con una subunidad de PorA y dos de PorB. Otra posible explicación sería la participación de otras moléculas formando parte de los complejos, como otras proteínas o lipooligosacáridos. La presencia de otras proteínas es más contravertida ya que el análisis LC-MS/MS es altamente sensible y permite la identificación de proteínas en muestras complejas. Sin embargo, no lo podemos descartar debido a que en las identificaciones de dichos complejos sí se detectaron péptidos de otras proteínas de *N. meningitidis* como la TbpB aunque por la baja puntuación (*score*) alcanzada no se han incluido en los resultados.

Los resultados obtenidos con la electroforesis 2D hrCNE/SDS-PAGE apoyaron los análisis por LC-MS/MS. Como en este tipo de análisis parten de una 1-D en la que, como es el caso, pueden darse co-migraciones de distintos complejos en una banda, la información obtenida se limita a la composición proteica de una banda sin poder discernir si corresponde a uno o varios complejos sin otro experimento que lo aclare. Además, proporcionó un mapa proteico con excelente enfoque pudiendo asignar cada punto a su correspondiente banda, siempre y cuando la intensidad de ambos así lo permitió. Con este segundo análisis bidimensional fueron detectados otros posibles complejos proteicos que no fueron detectados en la bidimensional nativa, como los complejos de Opa, el complejo de TbpAB y los complejos de porinas de alto peso molecular. Además, hizo todavía más evidente la necesidad de utilizar distintas condiciones de

solubilización en la separación nativa de los complejos en la 1-D, ya que algunos de estos complejos sólo permanecieron estables con uno de los detergentes. Los complejos de Opas solo se detectaron a partir de la separación con TX100, mientras que el complejo TbpAB y los complejos de porinas de alto peso molecular conteniendo la proteína MIP sólo se consiguieron resolver en la 1-D con DDM.

La presencia del complejo proteico TbpAB es coherente con el modelo propuesto para el receptor de la transferrina, formado por TbpB, responsable de la captación de la transferrina, y TbpA responsable de su transporte²⁰². En el formado por las proteínas Opa y *Opacity-related protein*, la disposición alineada en el gel de estas proteínas sugieren su asociación en complejos; sin embargo, al no disponer de datos por LC-MS/MS del complejo intacto y la ausencia de referencias sobre estructuras superiores a la terciaria de estas proteínas en la bibliografía consultada, nos hace ser cautos, por lo que únicamente sugerimos su posible asociación, aunque serían necesarias otras pruebas para confirmarla.

La asociación de la proteína MIP a los complejos de porinas de alto peso molecular no ha sido descrita hasta el momento, sin que hayamos encontrado una justificación definitiva que explique el motivo de esta asociación. Los potenciadores de la infectividad de macrófagos son una familia de proteínas de microorganismos celulares como *Chlamydia trachomatis*²⁰³, *Trypanosoma cruzi* o *Legionella pneumophila*, en la que es un importante factor de virulencia que posibilita la trans migración a través del epitelio pulmonar y aumenta la

²⁰² **Gómez JA, Criado MT, Ferreirós CM.** Cooperation between the components of the meningococcal transferrin receptor, TbpA and TbpB, in the uptake of transferrin iron by the 37-kDa ferric-binding protein (FbpA). *Res Microbiol.* 1998; 149: 381-387.

²⁰³ **Lundemose AG, Kay JE, Pearce JH.** *Chlamydia trachomatis* Mip-like protein has peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity that is inhibited by FK506 and rapamycin and is implicated in initiation of chlamydial infection. *Mol Microbiol.* 1993; 7: 777-783.

supervivencia intracelular²⁰⁴. En *Neisseria gonorrhoeae* ha sido detectada una lipoproteína, Ng-MIP, que presenta alta homología con los MIPs, y que aumenta la supervivencia en el interior de macrófagos, célula que infecta durante el proceso infeccioso²⁰⁵. Es posible que en *N. meningitidis* ejerza un papel similar a *N. gonorrhoeae* aumentando su supervivencia en el interior celular para atravesar el epitelio de la nasofaringe o la barrera hematoencefálica. La porina PorB también juega un importante papel en la supervivencia del meningococo en el interior celular, inhibiendo la apoptosis de la célula infectada¹⁴⁰ por modulación del potencial de membrana mitocondrial, por lo que no es descartable una acción conjunta.

Todos los mutantes utilizados en el presente estudio se obtuvieron de la cepa H44/76 por inserción del gen de la resistencia a la kanamicina en el gen diana en los que la correcta identificación de las proteínas defectivas fue previamente realizada²⁰⁶ y concordante con nuestros datos obtenidos. Un trabajo reciente en el que se utilizó PorA recombinante demuestra que esta porina tiene un menor ratio de transporte que otras porinas bacterianas incluyendo la PorB del meningococo²⁰⁷. Esta anotación es coherente con la observación en experimentos realizados con estas cepas en los que la tasa de crecimiento de la cepa mutante PorB- fue menor que la de las cepas salvaje y demás mutantes²⁰⁰, pudiendo ser explicado por el menor ratio de transporte mediado por los poros PorA. El mutante PorB-, además de las características de crecimiento comentadas, mostró serias alteraciones en la formación de los poros. Los complejos Cx1-Cx9 no se

²⁰⁴ **Wagner C, Khan AS, Kamphausen T, Schmausser B, Unal C et al.** Collagen binding protein Mip enables *Legionella pneumophila* to transmigrate through a barrier of NCI-H292 lung epithelial cells and extracellular matrix. *Cell Microbiol.* 2007; 9: 450-462.

²⁰⁵ **Leuzzi R, Serino L, Scarselli M, Savino S, Fontana MR et al.** Ng-MIP, a surface-exposed lipoprotein of *Neisseria gonorrhoeae*, has a peptidyl-prolyl cis/trans isomerase (PPIase) activity and is involved in persistence in macrophages. *Mol Microbiol.* 2005; 58: 669-681.

²⁰⁶ **Vipond C, Wheeler JX, Jones C, Feavers IM, Suker J.** Characterization of the protein content of a meningococcal outer membrane vesicle vaccine by polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Hum Vaccin.* 2005; 1: 80-84.

²⁰⁷ **Cervera J, Komarov AG, Aguilera VM.** Rectification properties and pH-dependent selectivity of meningococcal class 1 porin. *Biophys J.* 2008; 94: 1194-1202.

formaron y prácticamente la totalidad de la porina PorA se encontró formando un complejo o agregado de alto peso molecular (≈ 800 kDa), mientras que en el mutante PorA- existieron complejos de porinas, formados por PorB o PorB/RmpM. Estas observaciones cuestionan la relevancia del papel fisiológico de la PorA en el metabolismo de la bacteria y confirman un papel clave de la porina PorB en la estructura de los complejos de porinas. Pudiera ser que la PorA tuviese menor importancia que PorB en el transporte de solutos; de hecho, otras especies del género únicamente expresan una porina, homóloga a la codificada por el gen *porB*^{134,208}. Esto se ve apoyado por la alta variabilidad antigénica e inmunodominancia de PorA, por lo que serviría de señuelo desviando la unión de Igs a componentes de la membrana externa funcionalmente más importantes en etapas críticas de la infección bacteriana.

El mutante PorA-, así como las imágenes 2-D hrCNE/SDS-PAGE obtenidas con las cepas heterólogas NZ98/254, Nmp27, 3061, 3063 y Nm26 mostraron la presencia de complejos PorB/RmpM, a pesar de no ser detectados en las identificaciones por LC-MS/MS.

El mutante RmpM- confirmó la participación de la RmpM en ciertos complejos de porinas ya observada por los resultados con la cepa salvaje, mostrando un incremento de la proporción de complejos PorB y PorA/PorB como consecuencia de la suma de los ya existentes más los que formaban complejo con RmpM. La participación de RmpM en los complejos de porinas había sido constatada ya por Tommassen y colaboradores¹⁹⁷, mientras que en otros trabajos muestran la asociación a otras proteínas como proteínas de captación de hierro¹⁴² o a la proteína de síntesis de membrana Omp85¹⁹⁶. Se ha propuesto que la función de la RmpM podría ser de estabilización de los complejos de porinas debido a las observaciones de una mayor susceptibilidad de

²⁰⁸ **Arakere G, Kessel M, Nguyen N, Frasch CE.** Characterization of a stress protein from group B *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol.* 1993; 175: 3664-3668.

estos complejos a la desnaturalización por SDS a baja temperatura en ausencia de RmpM. Sin embargo, la presencia de complejos de PorB y PorA/PorB estables tanto con RmpM como sin ella y la unión a otras proteínas resta importancia a la función estabilizadora y apunta a la existencia de otro papel. La proteína RmpM presenta el dominio C-terminal similar al de la proteína OmpM de *E. coli* por el que se une al peptidoglicano¹⁴³ pudiendo, de este modo, mediar el anclaje de los complejos de porinas a la capa peptidoglicano con fines funcionales.

Los complejos proteicos CxChap, CxGlu y CxKet se detectaron consistentemente en todas las cepas estudiadas, siendo identificados como homómeros de chaperonina de 60 kDa, de glutamina sintetasa y de cetol-ácido reductoisomerasa. Sus homólogas en otras especies bacterianas se asocian en estructuras cuaternarias homoméricas. La conformación de los complejos de la proteína chaperonina de 60 kDa es la de dos anillos heptaméricos superpuestos, cuyo peso molecular coincide con el observado para CxChap²⁰⁹. Sin embargo, esta conformación puede variar según la especie, como ocurre con la *chaperonin Skp* de *E. coli* que forma trímeros²¹⁰. La presencia de esta proteína en la membrana externa, a pesar de su localización predicha citoplasmática, es coherente con su detección en otras especies asociada a la membrana externa²³⁵, y la existencia de anticuerpos anti-chaperonina en sueros de individuos convalecientes de la enfermedad meningocócica²¹¹.

También han sido detectados complejos análogos a CxGlu y CxKet en otras especies bacterianas. La glutamina sintetasa se asocia formando dos anillos

²⁰⁹ Pannekoek Y, Dankert J, van Putten JP. Construction of recombinant neisserial Hsp60 proteins and mapping of antigenic domains. *Mol Microbiol.* 1995; 15: 277-285.

²¹⁰ Qu J, Mayer C, Behrens S, Holst O, Kleinschmidt JH. The trimeric periplasmic chaperone Skp of *Escherichia coli* forms 1:1 complexes with outer membrane proteins via hydrophobic and electrostatic interactions. *J Mol Biol.* 2007; 374: 91-105.

²¹¹ Pannekoek Y, Schuurman IG, Dankert J, van Putten JP. Immunogenicity of the meningococcal stress protein MSP63 during natural infection. *Clin Exp Immunol.* 1993; 93: 377-381.

hexaméricos superpuestos²¹² y es co-transcrita y/o asociada a proteínas integrales de membrana implicadas en el transporte de componentes nitrogenados²¹³, mientras que los complejos de la cetol-ácido reductoisomerasa están formados por seis dímeros. En ambos casos, los pesos moleculares esperados a partir del peso de cada subunidad coincide con los observados en las hrCNE, si bien esta no es una prueba fiable dada la escasa capacidad de la hrCNE para deducir pesos moleculares a partir de los estándares.

A pesar de que la identificación por MALDI-TOF a partir de este tipo de mapas bidimensionales no permite un análisis exhaustivo de la composición proteica total de las OMVs, dado que quedan fuera del análisis las proteínas y complejos solubles con carga neta positiva a pH 7.0, y las proteínas y complejos con carga neta negativa a pH 7.0 con un tamaño molecular menor a 60 kDa, sí permitió un análisis orientativo de su composición y reflejó la escasa contaminación por proteínas citoplasmáticas durante la obtención de las preparaciones de OMVs. Los trabajos publicados sobre composición proteica de OMVs de *N. meningitidis*, muestran porcentajes de proteínas de membrana externa sobre el total de identificadas de 6,4%¹²⁴, 27%²¹⁴ o 59,4%¹²⁵, todas ellas a partir de extracciones con DOC. Aunque la presencia de proteínas citoplasmáticas en OMVs, así como la de ADN y ARN, es un hecho documentado en distintas especies bacterianas²¹⁵, con la metodología utilizada en este trabajo el porcentaje de proteínas de membrana fue del 63% sugiriendo que la extracción con Prensa de French es un método de extracción de OMVs que

²¹² Hill HS, Pfluegl GM, Eisenberg D. Multicopy crystallographic refinement of a relaxed glutamine synthetase from *Mycobacterium tuberculosis* highlights flexible loops in the enzymatic mechanism and its regulation. *Biochemistry* 2002; 41: 9863–9872.

²¹³ Arcondéguy T, Jack R, Merrick M. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001; 65: 80-105.

²¹⁴ Gil J, Betancourt LZ, Sardiñas G, Yero D, Niebla O *et al.* Proteomic study via a non-gel based approach of meningococcal outer membrane vesicle vaccine obtained from strain CU385: a road map for discovering new antigens. *Hum Vaccin.* 2009; 5: 347-356.

²¹⁵ Lee EY, Choi DS, Kim KP, Gho YS. Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrom Rev.* 2008; 27: 535-555.

conlleve una menor contaminación por proteínas citoplasmáticas que la extracción con detergentes, como ya había sido documentado en trabajos anteriores en nuestro laboratorio²⁰⁰.

**CAPÍTULO II: Análisis de la respuesta inmune frente a vesículas de
membrana externa y complejos proteicos de membrana externa
purificados**

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Indicadores de protección contra la enfermedad meningocócica

1.1.1. Actividad bactericida del suero

Con la excepción de unas pocas áreas del planeta como el África subsahariana, la incidencia de la enfermedad meningocócica es demasiado baja como para diseñar estudios aleatorizados que determinan la eficacia de las vacunas. Por lo tanto, esta eficacia es inferida a través de ensayos en los que se evalúa una determinada función inmunológica, y a partir de los cuales se establecen unos resultados que sirven de indicador de protección contra la enfermedad. La actividad bactericida de los anticuerpos del suero ha mostrado tener una alta correlación con la inmunidad a la enfermedad meningocócica. Como hemos visto en la introducción a la enfermedad meningocócica (apartado 3.3.1), los anticuerpos bactericidas mantienen un papel central en la defensa contra el meningococo. Esta característica ha sido aceptada a partir de una serie de observaciones²¹⁶:

- La capacidad del antisuero meningococal terapéutico para reducir en gran medida la mortalidad por enfermedad meningocócica.
- La rareza de segundos episodios de enfermedad meningocócica causada por el mismo serogrupo bajo condiciones epidémicas.
- Relación inversa entre la incidencia de la enfermedad meningocócica y el dominio dependiente de edad de anticuerpos bactericidas.
- La alta susceptibilidad a la enfermedad meningocócica invasiva en individuos con defectos en los componentes finales de la cascada del complemento constituyentes del complejo de ataque a membrana.

²¹⁶ **Frasch CE, Borrow R, Donnelly J.** Bactericidal antibody is the immunologic surrogate of protection against meningococcal disease. *Vaccine*. 2009; 27: 112-116.

- Las vacunas meningococales polisacarídicas y de vesículas de membrana externa inducen anticuerpos bactericidas y son eficaces.

Es por ello que la actividad bactericida del suero es considerado el mejor indicador de inmunidad frente a la enfermedad meningocócica, especialmente frente a la producida por el serogrupo C y se determina a través del denominado ensayo de actividad bactericida. Para llevar a cabo el ensayo, se incuban diluciones seriadas del suero a testar con la cepa diana y una fuente de complemento exógena. Aquellos anticuerpos específicos se unirán a la superficie meningococal a través de antígenos capsulares o subcapsulares. La subunidad C1q del componente C1 del sistema del complemento se une a la región Fc de la inmunoglobulina unida a superficie, activando de este modo la vía clásica del complemento, que finalmente resultará en la muerte de la célula bacteriana. El título de actividad bactericida del suero se expresa como la máxima dilución del suero que reduce en un 50% o más el número de células viables respecto a las presentes antes de la incubación²¹⁷.

El indicador original de protección meningocócica fue establecido en los años 60 por Goldschneider y colaboradores²¹⁸ contra el serogrupo C como un título de actividad bactericida del suero ≥ 4 , determinado en estudios con reclutas militares durante 8 semanas en EEUU; se observó que sólo 3 de los 54 casos meningococales tenían títulos de actividad bactericida del suero ≥ 4 antes del seguimiento comparado con los 444 de 540 casos que no contrajeron la infección y que sí tenían títulos de actividad bactericida ≥ 4 . Los trabajos de Goldschneider y colaboradores fueron realizados con suero humano agammaglobulémico como fuente de complemento exógena. Sin embargo, debido a las dificultades que ofrece el complemento humano a la

²¹⁷ **Borrow R, Balmer P, Miller E.** Meningococcal surrogates of protection--serum bactericidal antibody activity. *Vaccine*. 2005; 23: 2222-2227.

²¹⁸ **Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS.** Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med*. 1969; 129: 1307-1326.

hora de estandarizar y comparar resultados entre laboratorios, la Organización Mundial de la Salud recomienda desde 1976 el uso de complemento de cría de conejo comercial (*Baby Rabbit Complement*) en los ensayos de actividad bactericida estandarizados para la evaluación de vacunas meningococales polisacáridicas²¹⁹. Es sabido que el meningococo es más susceptible a la lisis mediada por complemento en presencia de complemento de conejo que con el humano, por lo que el ensayo de actividad bactericida fue re-evaluado para su realización con complemento de conejo²²⁰. De acuerdo con lo observado por Goldschneider también se encontraron relación entre la edad y la incidencia de la enfermedad, aunque la relación inversa entre la prevalencia de los títulos de anticuerpos protectivos y la incidencia de la enfermedad resultó mejor explicada con un título de actividad bactericida con complemento de conejo ≥ 8 .

En los estudios de eficacia de vacunas conjugadas contra el serogrupo C, se encontró una fuerte correlación entre un título de actividad bactericida con complemento de conejo ≥ 8 y eficacia vacunal en adolescentes tras el primer mes desde la vacunación, mostrando ser un buen indicador de protección a corto plazo. Sin embargo, 7 meses después de la vacunación, todos los títulos subestimaron la eficacia vacunal observada en adolescentes sugiriendo que los individuos son menos dependientes de la memoria inmunológica o que presentan bajos niveles de anticuerpos funcionales no detectados en el ensayo de actividad bactericida. Actualmente, la correlación de protección a corto plazo para el serogrupo C se establece como un título de actividad bactericida con complemento de conejo ≥ 8 , aunque la protección a largo plazo requiere un mayor conocimiento de las bases inmunológicas.

²¹⁹ **World Health Organization.** Requeriments for meningococcal polysacharide vaccine. World Health Organization technical report series, no. 594. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1976.

²²⁰ **Trotter C, Borrow R, Andrews N, Miller E.** Seroprevalence of meningococcal serogroup C bactericidal antibody in England and Wales in the pre-vaccination era. *Vaccine*. 2003; 21: 1094-1098.

El ensayo de actividad bactericida se ha utilizado eficazmente para determinar la inmunogenicidad de vacunas contra los serogrupos A, C, Y y W135 acompañado de ELISA para determinar la especificidad de anticuerpos anticapsulares. Por el contrario, la predicción de la eficacia de las vacunas meningococales contra el serogrupo B está obstaculizada por la ausencia de unos apropiados indicadores de protección. La inmunogenicidad de las vacunas basadas en OMVs, las únicas que han demostrado ser efectivas hasta la fecha, ha sido inicialmente determinada por ensayos de actividad bactericida²²¹, proponiendo como título protectivo provisional ≥ 4 . Mediante ELISA se ha constatado el incremento de IgG (≥ 4) anti-OMVs entre antes y después de la vacunación, aunque actualmente no se dispone de una correlación entre el incremento de IgG y protección.

1.2. Otros mecanismos relacionados con la protección frente al meningococo B

Debido a que las vacunas basadas en OMVs contienen epitopos subcapsulares que podrían inducir un amplio rango de respuestas inmunológicas, podrían ser adecuados como indicadores de protección otros mecanismos de la respuesta inmune involucrados en la inmunidad frente al serogrupo B. Actualmente se han desarrollado diferentes ensayos que evalúan distintos aspectos de la respuesta inmune con el objetivo de tener un mayor conocimiento de la compleja respuesta generada por las vacunas de OMVs y así poder establecer unos indicadores de protección fiables. Estos ensayos incluyen ensayos de unión de anticuerpos a superficie, ensayos de deposición de C3b, de deposición de MAC, ensayos de opsonofagocitosis, ensayo de actividad bactericida de la sangre completa o ELISA de anticuerpos salivares, descritos brevemente a continuación.

²²¹ **Holst J, Feiring B, Fuglesang JE, Høiby EA, Nøkleby H et al.** Serum bactericidal activity correlates with the vaccine efficacy of outer membrane vesicle vaccines against *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. *Vaccine*. 2003; 21: 734-737.

1.2.1. Unión de anticuerpos a superficie (SLA)

El ensayo de unión a superficie (*surface binding assay*) detecta la unión de total de anticuerpos a la superficie del meningococo. Este ensayo aporta información de la cantidad de unión de anticuerpos al meningococo de un determinado suero, y la accesibilidad de un determinado antígeno, aunque requiere datos complementarios de otros experimentos para relacionar esta unión de anticuerpos a un mecanismo de protección³⁸.

1.2.2. Deposición de Complemento (CDA)

Estudios previos han mostrado que ciertos anticuerpos antimeningococales confieren protección contra la bacteremia meningocócica en ausencia de actividad bactericida^{222,223}. Se ha sugerido que la protección podría estar asociada a la habilidad de los anticuerpos para activar la deposición de C3b en la superficie del meningococo encapsulado y la consiguiente formación de la convertasa de C3. El componente C3b, al igual que la porción Fc de los anticuerpos IgG, son ligandos conocidos de receptores de células fagocíticas funcionando como opsoninas que potencian la captación y eliminación de las bacterias, por lo que el ensayo de deposición de C3b, en el que se cuantifica la unión de esta molécula a la superficie bacteriana, funcionaría como indicador de la habilidad del suero para mediar protección. Del mismo modo posibilita detectar componentes tardíos de la cascada del complemento, como el complejo de ataque a membrana

²²² Welsch JA, Moe GR, Rossi R, Adu-Bobie J, Rappuoli R *et al.* Antibody to genome-derived neisserial antigen 2132, a *Neisseria meningitidis* candidate vaccine, confers protection against bacteremia in the absence of complement-mediated bactericidal activity. *J Infect Dis.* 2003; 188: 1730–1740.

²²³ Welsch JA, Rossi R, Comanducci M, Granoff DM. Protective activity of monoclonal antibodies to genome-derived neisserial antigen 1870, a *Neisseria meningitidis* candidate vaccine. *J Immunol.* 2004; 172: 5606–5615.

analizando más en profundidad los acontecimientos entre la unión del anticuerpo y la muerte o supervivencia de la bacteria.

1.2.3. Opsonofagocitosis

La eliminación del meningococo por opsonofagocitosis ha sido demostrada^{224,225} pudiendo ser el principal mecanismo de protección en individuos con deficiencias en los últimos componentes del sistema del complemento²²⁶. Existen distintas metodologías para la medición de la opsonofagocitosis del meningococo^{227,228,229,38}; sin embargo, la ausencia de una estandarización del método limita en gran medida la comparación de resultados entre laboratorios.

Las metodologías que miden más directamente la función inmunológica son los basados en citometría de flujo, como los desarrollados por *National Institute of Public Health* de Noruega (*National Institute of Public Health Opsonophagocytic Assay [NIPH OPA]*)²²⁹ y por la *Health Public Agency* de Reino Unido (*Porton Opsonophagocytic Assay [Porton OPA]*)³⁸. Estas dos aproximaciones emplean una fuente de complemento exógena, posibilitando la dilución de los sueros sin restar efectividad al

²²⁴ **Bredius RG, Derkx BH, Fijen CA, de Wit TP, de Haas M et al.** Fc gamma receptor IIa (CD32) polymorphism in fulminant meningococcal septic shock in children. *J Infect Dis.* 1994; 170: 848-853.

²²⁵ **Estabrook MM, Christopher NC, Griffiss JM, Baker CJ, Mandrell RE.** Sialylation and human neutrophil killing of group C *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis.* 1992; 166: 1079-1088.

²²⁶ **Schlesinger M, Greenberg R, Levy J, Kayhty H, Levy R.** Killing of meningococci by neutrophils: effect of vaccination on patients with complement deficiency. *J Infect Dis.* 1994; 170: 449-453.

²²⁷ **Halstensen A, Haneberg B.** Standardization of a chemiluminescence method for the measurement of meningococcal opsonins using ethanol fixed meningococci. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C.* 1987; 95: 155-160.

²²⁸ **Plested JS, Granoff DM.** Vaccine-induced opsonophagocytic immunity to *Neisseria meningitidis* group B. *Clin Vaccine Immunol.* 2008; 15: 799-804.

²²⁹ **Aase A, Michaelsen TE.** Opsonophagocytic activity induced by chimeric antibodies of the four human IgG subclasses with or without help from complement. *Scand J Immunol.* 1994; 39: 581-587.

complemento y eliminando las variaciones generadas por la variabilidad interindividual de los sueros donados. A pesar de que ambos protocolos se basan en la citometría de flujo, los parámetros medidos para evaluar la opsonofagocitosis difieren.

La metodología noruega detecta la actividad fagocítica de granulocitos polimorfonucleares a través de la emisión de fluorescencia del pigmento con el que son teñidos, el cual es excitado por el fuerte incremento de la actividad respiratoria (*respiratory burst*) en los granulocitos al metabolizar el meningococo fagocitado. Las bacterias diana se emplean vivas y sin pigmentar, por lo que se minimiza la alteración de epitopos superficiales. Sin embargo, la utilización de granulocitos donados dificulta la estandarización entre laboratorios por las diferencias interindividuales de los donantes.

El ensayo desarrollado por la *Health Public Agency* de Reino Unido³⁸ es una adaptación al meningococo del ensayo establecido como indicador de protección para *Streptococcus pneumoniae*²³⁰. Este protocolo utiliza como células fagocíticas células de la línea celular HL60 diferenciadas a granulocitos con dimetilformanida, lo que permite una estandarización del tipo celular fagocítico de partida. La fluorescencia es emitida, en este caso, por un pigmento fluorescente interno con el que son teñidos los meningococos, evitando de este modo alterar epitopos superficiales con pigmentos externos. De este modo, la fagocitosis es detectada no por un incremento de la actividad oxidativa, sino por la emisión de fluorescencia de los meningococos internalizados por los granulocitos. La presentación de los resultados también limita la comparación entre ambos ensayos, ya que NIPH OPA utiliza diluciones seriadas del suero expresando los resultados como

²³⁰ **Martínez JE, Romero-Steiner S, Pilishvili T, Barnard S, Schinsky J et al.** A flow cytometric opsonophagocytic assay for measurement of functional antibodies elicited after vaccination with the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6: 581-586.

títulos mientras que Porton OPA utiliza índices de fluorescencia para una dilución de suero que se mantiene constante.

1.2.4. Actividad bactericida de la sangre total

El ensayo de sangre total (*whole-blood assay*) determina la actividad bactericida total de la sangre, incluyendo fagocitosis y lisis mediada por complemento. Este ensayo ha sido postulado como un ensayo más sensitivo que el de la actividad bactericida del suero^{231,232}; sin embargo, las grandes cantidades de sangre fresca necesarias para su desarrollo dificulta su estandarización y control y podría, por lo tanto, no resultar válido para ensayos clínicos³⁸.

1.2.5. ELISA de anticuerpos salivares

Otro ensayo utilizado previamente en estudios de vacunas meningocócicas es el ELISA de anticuerpos salivares²³³. Parte del éxito de las vacunas conjugadas contra el serogrupo C ha sido la inmunidad poblacional debido a la reducción del número de portadores, presumiblemente mediada por respuestas en superficies mucosas, por lo que requiere su evaluación debido a la importancia de los posibles efectos de los anticuerpos de mucosas en el estado de portador²³⁴.

²³¹ Ison CA, Anwar N, Cole MJ, Galassini R, Heyderman RS *et al.* Assessment of immune response to meningococcal disease: comparison of a whole-blood assay and the serum bactericidal assay. *Microb Pathog.* 1999; 27: 207-214.

²³² Morley SL, Cole MJ, Ison CA, Camaraza MA, Sotolongo F *et al.* Immunogenicity of a serogroup B meningococcal vaccine against multiple *Neisseria meningitidis* strains in infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2001; 20: 1054-1061.

²³³ Borrow R, Fox AJ, Cartwright K, Begg NT, Jones DM. Salivary antibodies following parenteral immunization of infants with a meningococcal serogroup A and C conjugated vaccine. *Epidemiol Infect.* 1999; 123: 201-208.

²³⁴ Yero D, Pajón R, Pérez Y, Fariñas M, Cobas K *et al.* Identification by genomic immunization of a pool of DNA vaccine candidates that confer protective immunity in mice against *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Vaccine.* 2007; 25: 5175-5188.

En este trabajo estudiaremos las características antigénicas de complejos proteicos purificados mediante los ensayos de actividad bactericida, unión de anticuerpos a superficie, deposición de complemento y opsonofagocitosis. También analizaremos las características antigénicas de OMVs de cepas mutantes defectivas en proteínas de los principales complejos proteicos de membrana externa por los ensayos mencionados.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas bacterianas, características y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas utilizadas para los siguientes ensayos fueron las descritas en el capítulo I (**tabla 5**). El conjunto de cepas heterólogas fue elegida de tal modo que compartiesen al menos uno de los epitopos de tipado respecto a la cepa H44/76 (B: 15:P1.7,16) y que estuviesen representados todos ellos.

Para los ensayos de citometría de flujo (unión de anticuerpos a superficie, deposición de complemento, opsonofagocitosis) las células de *N. meningitidis* se cultivaron en placas Petri con medio sólido *brain heart infusion* (BHI), suplementado con Levanthal, a 37 °C en atmósfera enriquecida al 5% CO₂, durante toda la noche.

Para los ensayos de actividad bactericida, las bacterias se cultivaron como se describe en el capítulo I (apartado 2.3), utilizando una concentración de Desferal en el medio Müller-Hinton de 50 µM. Las células fueron recuperadas en fase exponencial para su utilización en fresco.

2.2. Obtención de antígenos para la inmunización de animales de experimentación

2.2.1. Purificación de los complejos proteicos de membrana externa

La purificación de los complejos proteicos de membrana externa se llevó acabo por elución pasiva a partir de geles en gradiente (8-11% de PA) tras la electroforesis nativa hrCNE. La preparación de la muestra y de los geles, así como las condiciones eléctricas empleadas en la electroforesis se describen en el apartado 2.6 del capítulo I.

2.2.1.1. Separación de los complejos proteicos de membrana externa mediante electroforesis nativa hrCNE

Muestras de 2 mg de proteína total de OMVs de las cepas H44/76, PorA- y RmpM-, tratadas siguiendo el protocolo de preparación de muestra para electroforesis nativa hrCNE, se repartieron en 4 minigeles con un gradiente de PA (8-11%) en el gel separador y 5% de PA en el gel concentrador, este último moldeado con peine ciego formando un único pocillo continuo. La electroforesis se llevó a cabo utilizando como tampón de cátodo el tampón DDM, a 4 °C durante 6 horas aproximadamente.

Una vez transcurrida la electroforesis, de cada gel se cortó una tira vertical representativa de todo el gradiente en la que se incluyen los marcadores de peso molecular. Dicha tira se tiñó con CBB para ser utilizada como referencia a la hora de localizar las bandas correspondientes a los complejos a purificar en el resto de gel, el cual fue teñido con tinción reversible de zinc²³⁵.

2.2.1.2. Elución de complejos proteicos a partir de geles de poliacrilamida

En base a los resultados obtenidos en el capítulo anterior y utilizando como referencia la tira teñida con CBB, se localizaron y cortaron las bandas correspondientes a los complejos de interés en los geles teñidos con zinc. Las tiras de gel fueron destañadas con dos lavados de 5 minutos en solución EDTA 0,05 M y un lavado de 5 minutos en solución EDTA 0,01 M, para finalmente ser equilibradas

²³⁵ **Fernandez-Patrón C.** Zinc-Reverse Staining Technique. The protein Protocols Handbook. Ed: JM Walker© Human Press Inc., Totowa, NJ.

en tampón de cátodo con DDM para hrCNE. Los tacos de gel fueron desmenuzados mecánicamente en pequeños fragmentos y los complejos proteicos eluidos por elución pasiva, resuspendiendo los fragmentos de acrilamida en 2 mL de tampón DDM durante 24 horas a 25 °C. Los restos de gel se eliminaron con una centrifugación a $13000 \times g$ durante 5 minutos.

La elución de los complejos se comprobó mediante electroforesis hrCNE y tinción de Coomassie. El contenido proteico de cada eluido se determinó mediante electroforesis SDS-PAGE. Los eluidos se almacenaron a 4 °C hasta su uso no más de 5 semanas.

2.3. Obtención de sueros inmunes

Los sueros inmunes de ratón se obtuvieron utilizando como antígenos preparaciones de OMVs o complejos purificados siguiendo el protocolo de inmunización previamente descrito²³⁶. Por cada suero, se inmunizaron 10 ratones CBA de 4 semanas de edad, realizando un total de tres inmunizaciones espaciadas por 14 días. La sangre fue extraída transcurridos 5 días desde la administración de la última dosis de antígenos. La rutina de inmunización por ratón fue la siguiente:

2.3.1. Sueros anti-OMVs

- Día 0: 20 µg de OMVs en 50 µL de agua más 50 µL de adyuvante completo de Freund.
- Días 14 y 28: la misma dosis de antígeno en adyuvante incompleto de Freund.

²³⁶ Brodeur BR, Larose Y, Tsang P, Hamel J, Ashton F *et al.* Protection against infection with *Neisseria meningitidis* group B serotype 2b by passive immunization with serotype-specific monoclonal antibody. *Infect Immun.* 1985; 50: 510-516.

2.3.2. Sueros anti-complejos

- Día 0: 50 µL de purificado más 50 µL de adyuvante completo de Freund.
- Días 14 y 28: la misma dosis de antígeno en adyuvante incompleto de Freund.

Todos los ratones fueron sangrados 5 días después de la última inmunización. La sangre se dejó coagular 1 hora a temperatura ambiente para posteriormente mantenerla 3 horas a 4 °C y así retraer el coágulo. Una vez recuperado el suero se centrifugó 10 minutos a 2 000 \times g y se guardó en alícuotas de 300 µL a -80 °C.

2.4. Caracterización de los sueros por Western-blotting

2.4.1. SDS-PAGE

Muestras de OMVs con 8 µg de proteína total de la cepa H44/76 se diluyeron 1:1 en tampón de muestra 2x (glicerol al 10% (v/v), SDS al 2% (p/v), 2β-mercaptoetanol 0,7 M y azul de bromofenol al $1,25 \times 10^{-3}$) y se calentaron a 95 °C durante 10 minutos. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en geles verticales con un 12% de poliacrilamida tal, y como se indica en el apartado 2.5 del capítulo I.

2.4.2. hrCNE

Muestras de OMVs con 20 µg de proteína total de la cepa H44/76 se cargaron en un gel en gradiente de PA del 8 al 11% para hrCNE. La preparación de la muestra y desarrollo de la electroforesis se describen en el apartado 2.6 del capítulo I.

2.4.3. Western-blotting

Tras la separación de las proteínas y los complejos proteicos, se transfirieron a una membrana de PVDF siguiendo las instrucciones del fabricante, tal y como se explica a continuación:

Se cortaron dos piezas de papel Whatman y la membrana de PVDF del mismo tamaño que el gel a transferir. El papel Whatman y las almohadillas de fibra se equilibraron en tampón de transferencia (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% (v/v), pH 9.2) durante al menos 15 minutos. La membrana de PVDF se equilibró con un baño de 15 segundos en metanol, un lavado de 2 minutos en agua desionizada y un baño de 15 minutos en tampón de transferencia. Los diferentes componentes se montaron en forma de “sandwich” en el siguiente orden: una almohadilla de fibra, un papel Whatman, el gel a transferir, la membrana de polivinilideno fluoruro (PVDF), un papel Whatman y otra almohadilla de fibra, de tal modo que la membrana de PVDF quede situada entre el gel y el ánodo.

La transferencia de proteínas a la membrana se realizó aplicando una corriente constante de 350 mA durante 1 hora a 4 °C. Terminada la transferencia, la membrana se bloqueó en TBS con Blotto (Bio-Rad Lab., Richmond, CA, EEUU) al 5% y agitación continua durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó tres veces con TBS- Tween. Tras el lavado se incubó con los sueros de ratón anti-OMVs y anti-complejo a analizar, a diluciones 1:1000 y 1:100 respectivamente en TBS-Tween con Blotto 1%, durante 90 minutos a 37 °C en agitación. Tras tres lavados con TBS-Tween, la membrana se incubó durante 90 minutos a 37 °C en agitación, con anticuerpos de conejo anti-Ig de ratón conjugados a peroxidasa diluidos 1:1000 en TBS-Tween con Blotto al 1%. La membrana se lavó de nuevo tres

veces con TBS-Tween y se reveló con PBS/H₂O₂/4-cloro-1 α -naftol durante 20 minutos, deteniendo la reacción con agua desionizada.

2.5. Ensayo de actividad bactericida

Los ensayos de actividad bactericida fueron realizados según una variación del protocolo previamente descrito²³⁷ utilizando como fuente de complemento suero de cría de conejo comercial (*Baby Rabbit Complement*, Cedarlane, Canadá). Para eliminar la posible actividad bactericida intrínseca de la fuente de complemento, se realizó la adsorción de posibles anticuerpos específicos mediante 3 incubaciones de 1 hora a 4 °C en agitación con células vivas de cada cepa test (cultivadas como se detalla en el apartado 2.1) resuspendidas en el complemento de conejo reconstituido. Tras la adsorción, las bacterias fueron eliminadas por centrifugación (10 minutos a 10 000 \times g y 4 °C) y filtración, para finalmente ser alicuotado y almacenado a -80 °C hasta su uso.

El día del ensayo se mezcló, en pocillos de placas de microtitulación de fondo en U:

- 25 μ L de suspensión bacteriana ($1,46 \times 10^5$ cel/mL en tampón GBSS [*gelatin balanced salt solution*]).
- 50 μ L de suero test, previamente inactivado por calor (30 minutos a 54 °C) y diluido 1:4 en GBSS.
- 25 μ L de fuente de complemento, añadido siempre en último lugar.

²³⁷ **Zolliner WD, Brant BL, Tramont EC, Dobek AS.** Immune response to *Neisseria meningitidis*. En: Rese NR, Friedman H (Eds). Manual of Clinical Immunology. Washington DC:American Society for Microbiology. p. 446-453.

A tiempo 0 (t_0) y tras una incubación de 60 minutos (t_1) a 37 °C y 5% CO₂, se deslizaron 15 µL de cada mezcla a lo largo de placas con medio sólido GC-agar enriquecido con Biovitex, y se incubaron 24 horas a 37 °C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ para determinar el número de unidades formadoras de colonias (CFUs). La tasa de mortalidad (TM) expresada como % se calculó según la fórmula:

$$TM = 100 - \frac{(CFUs\ t_1) \times 100}{CFUs\ t_0}$$

A aquellos sueros que mostraron una reducción mayor o igual al 50% en el número de CFUs respecto al tiempo 0, se consideraron bactericidas. Los sueros bactericidas fueron titulados realizando diluciones seriadas, con un factor de dilución 1/2, y expresando su actividad bactericida como la máxima dilución final que mostró una reducción $\geq 50\%$ en el número de CFUs respecto a las obtenidas a tiempo 0.

Se incluyeron controles negativos sustituyendo los sueros inmunes, la fuente de complemento o ambos por GBSS, controles positivos con los sueros homólogos de cada cepa test. Cada ensayo se repitió al menos dos veces en diferentes días con dos réplicas cada uno.

2.6. Ensayos de citometría de flujo

Los ensayos de citometría de flujo (unión de anticuerpos a superficie, deposición de C3b y MAC, y opsonofagocitosis) se realizaron en colaboración

con el *Health Protection Agency, Centre for Emergency Preparedness and Response* (Reino Unido). Las medidas se realizaron con el citómetro de flujo Becton Coulter FC500.

Por seguridad en el manejo de las bacterias en los ensayos, se provocó la muerte de las bacterias utilizadas mediante incubación con azida sódica 0,2% (p/v) y fenilmetilsulfonil fluoruro 17µg/mL durante 48 horas a 37 °C. Las bacterias empleadas en el ensayo de opsonofagocitosis fueron teñidas previamente durante una hora con 10µg/mL del fluoróforo 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(6)-carboxifluoresceína (BCECF) (Calbiochem, Reino Unido) antes del proceso de muerte celular.

En aquellos experimentos que se requirió fuente de complemento se utilizó plasma humano agammaglobulémico. La eliminación de las IgG se realizó con una columna de afinidad ProteinG Sepahrose, inmediatamente antes de su uso. La columna se equilibró previamente con tres volúmenes de columna de solución salina tamponada de Hanks. Tras introducir un volumen de plasma humano e incubarse 5 minutos a 4 °C, se introdujo un volumen de solución salina para recuperar el complemento.

2.6.1. Ensayo de unión de anticuerpos a superficie

En cada ensayo, 2 µl de suero test y 198 µl de bacteria diana resuspendidas en solución de bloqueo (BSA 2% en PBS), ajustada a una densidad óptica a 600 nm de 0.1. Tras una incubación de 30 minutos con agitación (900 rpm) a 25.0°C, se centrifugó a 3000 \times g durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante y lavando tres veces el precipitado con 200 µl de solución de bloqueo. Posteriormente se añadieron 200µl de anticuerpo

conjugado de cabra anti-ratón/conejo/humano marcado con el fluoróforo FITC (Jackson Immunochemicals, USA) a una dilución 1:500 en solución de bloqueo. Todo ello fue incubado durante 20 minutos a 4°C antes de volver a ser lavado dos veces con solución de bloqueo para eliminar el excedente de fluoróforo.

En el canal FITC se determinaron regiones o *gates* en la población de bacterias del control negativo sin anticuerpos con únicamente complemento, incluyendo dentro de éstas aproximadamente el 10% de la población total. En cada una de las muestras test se midió la fluorescencia de 7500 bacterias, y el porcentaje de células que mostraron fluorescencia FITC en la región apropiada (% *gated*) se multiplicó por la fluorescencia media (*X-mean*) para calcular el índice de fluorescencia (FI). Al FI de cada muestra se le restó el FI del control sin anticuerpos y con complemento para obtener el valor FI-C'.

2.6.2. Ensayo de deposición de C3b

En una placa de microtitulación de 96 pocillos con fondo en U (Sterilin, Reino Unido) se mezclaron:

- 5 µl de cada suero test.
- 90 µl de suspensión bacteriana ajustada a OD₆₀₀=0,1 en solución de bloqueo (BSA 2% en PBS).
- 5 µl de complemento humano sin IgG.

La mezcla se incubó 30 minutos en agitación (900 rpm) a 25 °C. Cada mezcla fue centrifugada a 3000 x g durante 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado se lavó con solución de bloqueo. Tras repetir dos veces más los lavados se añadieron 200 µl anticuerpo de oveja anti-C3c

humano marcado con el fluoróforo FITC (Biodesign, Reino Unido) a 1:500 en solución de bloqueo. Se incubó durante 20 minutos a 4 °C antes de realizar los lavados dos veces más con solución de bloqueo.

En el canal FITC se determinaron *gates* en la población de bacterias del control con únicamente complemento, incluyendo dentro de éstas aproximadamente el 10% de la población total. En cada una de las muestras test se midió la fluorescencia de 7500 bacterias. El porcentaje de células que mostraron fluorescencia FITC en la región apropiada (*% gated*) se multiplicó por la fluorescencia media (*X-mean*) y así obtener el índice de fluorescencia (FI). Al FI de cada muestra se le restó el FI del control sin anticuerpos y con complemento para obtener el valor FI-C'.

2.6.3. Ensayo de deposición de MAC

En una placa de microtitulación de 96 pocillos con fondo en U (Sterilin, Reino Unido) se mezclaron:

- 5 µl de cada suero test.
- 90 µl de suspensión bacteriana ajustada a $OD_{600}=0,1$ en solución de bloqueo (BSA 2% en PBS).
- 5 µl de complemento humano sin IgG.

La mezcla se incubó 30 minutos en agitación (900 rpm) a 25 °C. Cada mezcla fue centrifugada a $3000 \times g$ durante 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado se lavó con solución de bloqueo. Tras repetir dos veces más los lavados se añadieron 200 µl de anticuerpo de ratón anti-C5b-9 humano marcado con Alexa 647 a 1:500 en solución de bloqueo. Se incubó

durante 20 minutos a 4 °C antes de realizar los lavados dos veces más con solución de bloqueo.

En el canal FITC se determinaron *gates* en la población de bacterias del control con únicamente complemento, incluyendo dentro de éstas aproximadamente el 10% de la población total. En cada una de las muestras test se midió la fluorescencia de 7 500 bacterias. El porcentaje de células que mostraron fluorescencia FITC en la región apropiada (*% gated*) se multiplicó por la fluorescencia media (*X-mean*) y así obtener el índice de fluorescencia (FI). Al FI de cada muestra se le restó el FI del control sin anticuerpos y con complemento para obtener el valor FI-C'.

2.6.4. Ensayo de Opsonofagocitosis

Para la determinación de la actividad opsonofagocítica del meningococo se utilizaron como fagocitos células de la línea celular HL60 (*American Type Cultures Collection*, Rockville MD, USA), diferenciadas a granulocitos con *N,N*-dimetilenformamida 0,8% (Sigma, Reino Unido) durante 5 días.

En una placa de microtitulación de 96 pocillos con fondo en U (Sterilin, Reino Unido) se mezclaron:

- 20 µl de cada suero test diluido 1:10 en tampón OP (*Hanks balanced salts solution* [Sigma, Reino Unido] conteniendo leche descremada en polvo 2% (p/v) [Marvel, Premier International Foods, Reino Unido], CaCl₂ 1,2mM y MgSO₄ 1mM [Sigma, Reino Unido]).
- 10 µl de suspensión bacteriana teñida, a una concentración celular de $6,25 \times 10^8$ en tampón OP.

- 10 µl de complemento humano sin IgG.

Tras una incubación en agitación (900 rpm) de 7,5 minutos a 37 °C, se añadieron 50 µl de células HL60 diferenciadas (2.5×10^7 cel/mL en tampón OP) y se continuó la incubación durante otros 7,5 minutos en las mismas condiciones. La opsonofagocitosis se paró añadiendo 80 µl de tampón PBS Dulbecco enfriado en hielo conteniendo 0,02% de EDTA (Sigma, Reino Unido).

En el canal de fluorescencia para el pigmento biscarboxietilcarboxil-fluoresceína (BCECF) se determinaron regiones homogéneas (*gates*) en la población de células HL60 del control s con únicamente complemento, incluyendo dentro de éstas aproximadamente el 10% de la población total. En cada una de las muestras test se midió la fluorescencia de 7500 células HL60 vivas, y se multiplicó el porcentaje de células que mostraron fluorescencia BCECF en la puerta apropiada (% *gated*) por la fluorescencia media de la población incluida en la puerta (*X-mean*) para calcular el índice de fluorescencia (FI). Al FI de cada muestra se le restó el FI del control sin anticuerpos y con complemento para obtener el valor FI-C'.

2.7. Análisis de los datos

Para comprobar la significancia de las diferencias entre los resultados obtenidos entre el SNI y los sueros inmunes en los ensayos de citometría de flujo se utilizó un test *t Student* no pareado

3. RESULTADOS

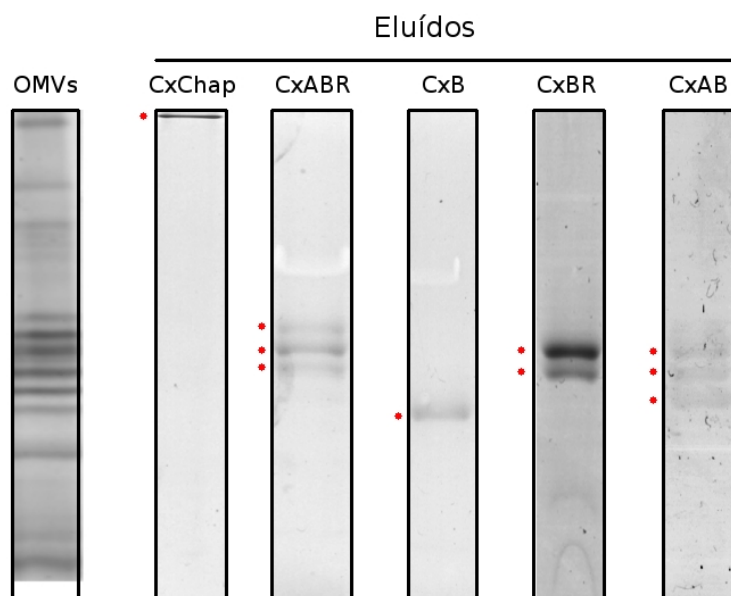
3.1. Purificación de los complejos proteicos

Para la obtención de sueros anti-complejos proteicos, fue necesaria la purificación de los complejos, eligiendo como método de purificación la elución pasiva a partir de geles de PA. Tanto la manipulación de los tacos de PA como el proceso de elución de los complejos se realizó bajo condiciones no desnaturalizantes, manteniendo la misma temperatura, pH y concentración de detergentes que las utilizadas en la separación electroforética de los mismos. Los complejos proteicos eluidos fueron el complejo formado por la Chaperonina de 60 kDa y cuatro asociaciones de porinas diferentes: PorA/PorB/RmpM, PorA/PorB, PorB/RmpM y PorB. Dada la proximidad entre las bandas de los complejos de porinas en los geles de PA, en la mayoría de los casos no se consiguió la purificación de cada uno de los complejos de forma individual por copurificación de los colindantes, por lo que se optó por obtener grupos de complejos proteicos, los cuales se muestran en la **figura 15**.

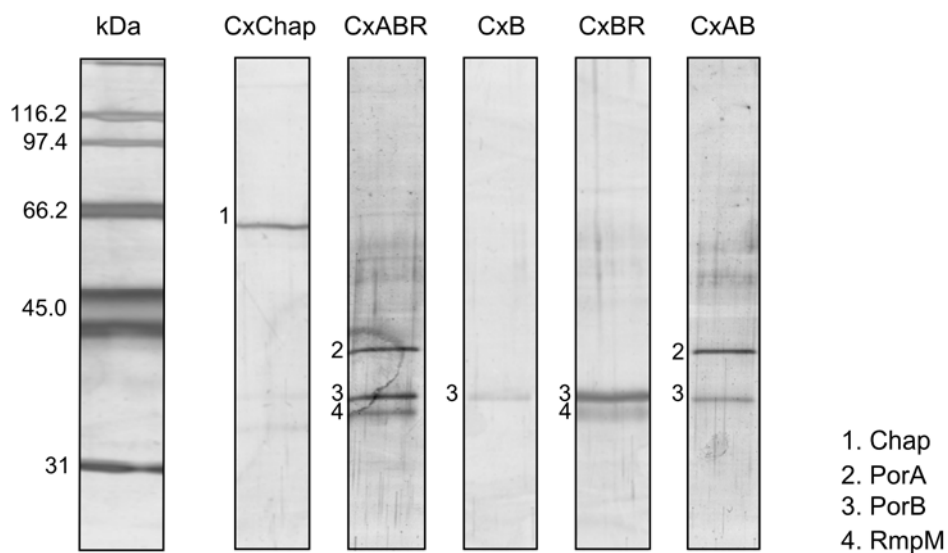
Por cada gel obtenido para el corte de bandas de interés, se tiñó con CBB una muestra del mismo y sirvió como referencia para cortar las correspondientes bandas en el resto del gel, teñido con tinción reversible de zinc. A partir de las OMVs de la cepa H44/76 se obtuvo el eluido CxABR, que incluye los complejos proteicos heteroméricos formados por las proteínas PorA, PorB y RmpM (PorA/PorB/RmpM, PorA/PorB y PorB/RmpM), y el eluido CxB correspondiente a homómeros de PorB. A partir de las OMVs de la cepa PorA- se obtuvieron el purificado CxChap, correspondiente al complejo homomérico de la chaperonina de 60 kDa, y el purificado CxBR correspondiente a complejos de porinas formados por PorB/RmpM y homómeros de PorB. Finalmente a partir de OMVs de mutante RmpM- se obtuvo el purificado CxAB correspondiente a

Figura 15. (A) Comprobación de los complejos proteicos presentes en los eluidos obtenidos por elución pasiva a partir de geles hrCNE, mediante hrCNE y tinción de Coomassie. Los complejos eluidos aparecen indicados con un punto rojo. (B) Comprobación de la composición proteica de los eluidos por SDS-PAGE y tinción de plata.

A



B



complejos de porinas en los que no participa la proteína RmpM (PorA/PorB y PorB).

Los eluidos obtenidos fueron analizados por hrCNE y tinción de CBB detectando los complejos proteicos presentes en cada uno de los eluidos, y por SDS-PAGE y tinción de plata para determinar su composición proteica (**figura 15**). De este modo, tal y como muestra la **figura 15A**, en el eluido CxChap se detectó una banda en el peso molecular del complejo de la chaperonina de 60 kDa, en el eluido CxABR se detectaron bandas en el peso molecular de los complejos de porinas formados por PorA/PorB/RmpM y PorA/PorB, en el eluido CxB se detectó una banda a la altura del homómero de PorB, en el eluido CxBR se detectaron dos bandas correspondientes a los complejos formados por PorB/RmpM y PorB, en el eluido CxAB se detectaron tres bandas a la altura de los complejos de PorA/PorB.

El análisis por SDS-PAGE y tinción de plata de los eluidos detectaron las proteínas presentes en cada uno de los complejos proteicos purificados, correspondiendo con los resultados del capítulo 1. De este modo, tal y como muestra la **figura 15 B**, en el eluido CxChap se detectó una banda del peso molecular de la chaperonina 60 kDa; en el eluido CxABR se detectaron las proteínas PorA, PorB y RmpM; en el eluido CxAB se detectaron las proteínas PorA, PorB; en el eluido CxBR se detectaron las proteínas PorB y RmpM y en el eluido CxB se detectó la proteína PorB.

3.2. Obtención de sueros inmunes y caracterización por Western-blotting.

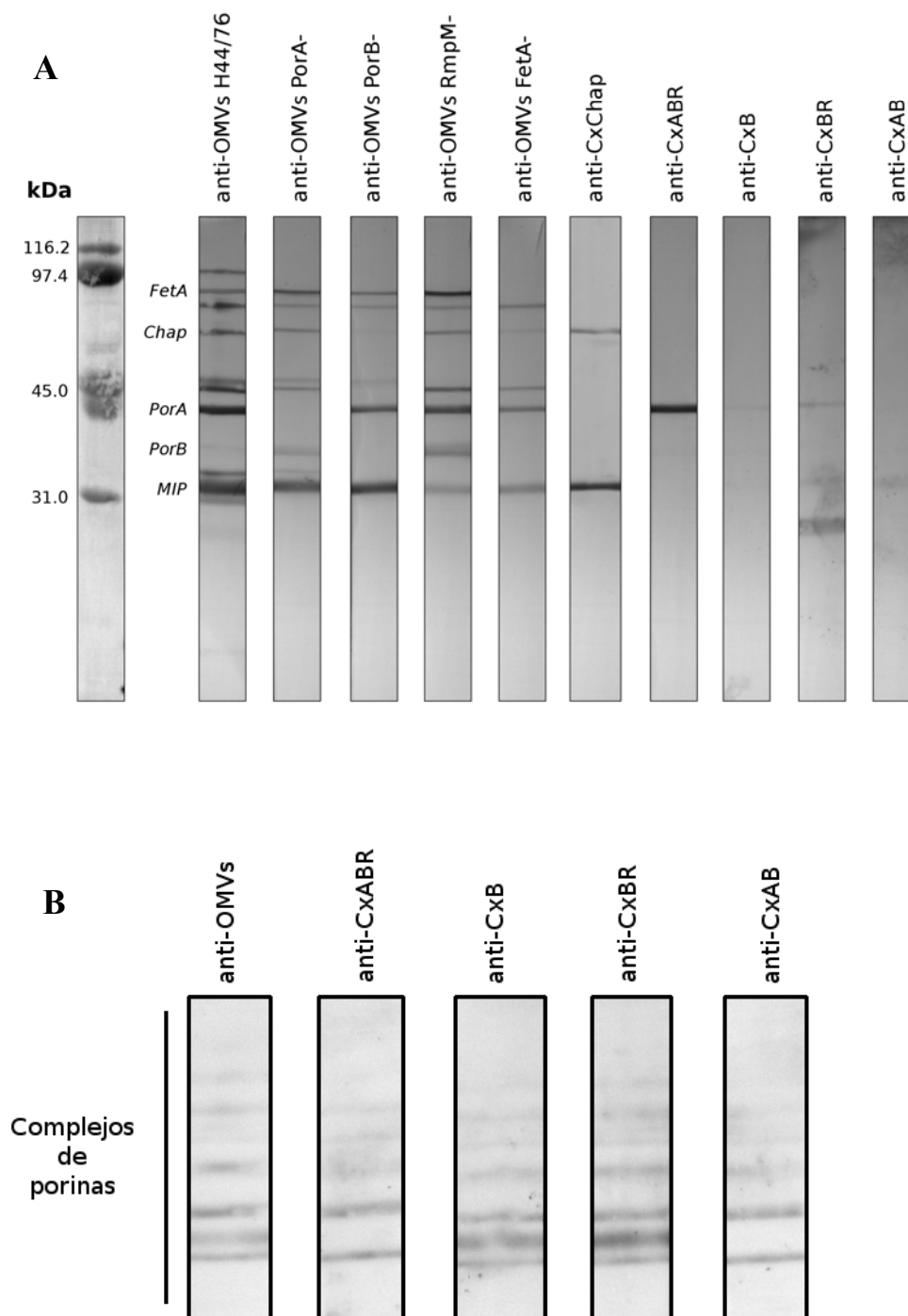
Se obtuvieron un total de 15 sueros inmunes, recogidos en la **tabla 9**, además un suero no inmune (SNI). Los sueros inmunes incluyen sueros frente OMVs del panel de cepas recogidas en la **tabla 5** (incluyendo cepas salvajes y mutantes), y sueros inmunes frente a complejos proteicos purificados, obtenidos por inmunización con los eluidos descritos en el apartado anterior. Todos los sueros anti-OMVs salvajes fueron utilizados como controles positivos con sus respectivas cepas en los ensayos de actividad bactericida, unión de anticuerpos a superficie, deposición de complemento y opsonofagocitosis, y el SNI como control negativo.

Tabla 9. Listado de sueros inmunes obtenidos por inmunización de ratones, y antígenos utilizados en la inmunización.

Suero	Antígeno	Cepa
<i>anti-OMVs salvajes</i>		
anti-OMVs H44/76	OMVs	H44/76
anti-OMVs NZ98/254	OMVs	NZ98/254
anti-OMVs 3063	OMVs	3063
anti-OMVs 3061	OMVs	3061
anti-OMVs Nm26	OMVs	Nm26
anti-OMVs NmP27	OMVs	NmP27
<i>anti-OMVs mutantes</i>		
anti-OMVs PorA-	OMVs	H44/76 PorA-
anti-OMVs PorB-	OMVs	H44/76 PorB-
anti-OMVs RmpM-	OMVs	H44/76 RmpM-
anti-OMVs FetA	OMVs	H44/76 FetA-
<i>anti-complejos</i>		
anti-Chap	eluido CxChap	H44/76 PorA-
anti-CxABR	eluido CxABR	H44/76
anti-CxAB	eluido CxAB	H44/76 RmpM-
anti-CxBR	eluido CxBR	H44/76 PorA-
anti-CxB	eluido CxB	H44/76

Los sueros anti-OMVs H44/76, anti-OMVs mutantes y anti-complejos fueron caracterizados por Western-blotting a partir de gel de SDS-PAGE en el que se cargó como muestra OMVs de la cepa homóloga H44/76 (**figura 16A**). Utilizando como referencia los estándares de peso molecular y la información obtenida a partir de los sueros anti-OMVs mutantes, se identificaron una serie de proteínas antigénicas, indicadas también en la figura. El suero anti-OMVs H44/76 reconoció un total de 12 proteínas, entre las cuales se hallan las proteínas MIP, PorB, PorA, Chaperonina de 60 kDa y FetA. La unión contra la porina PorA fue mucho mayor que contra PorB y de similar intensidad que contra la proteína MIP. El suero anti-OMVs PorA- no reconoció la porina PorA y mostró un incremento en la unión a la porina PorB. El suero anti-OMVs PorB- no detectó la PorB y mostró menor cantidad de anticuerpos anti-CxChap. El suero anti-OMVs RmpM- mostró mayor intensidad en la banda de la PorB y la FetA. El suero anti-OMVs FetA- no detectó las proteínas FetA y PorB.

Figura 16. (A) Caracterización por Western-blotting de los sueros inmunes anti-OMVs H44/76, anti-OMVs mutantes y anti-complejos frente a proteínas de OMVs de la cepa homóloga H44/76 separadas por SDS-PAGE. (B) Caracterización por Western-blotting de los sueros anti-complejos de porinas frente a los complejos proteicos de OMVs de las cepa H44/76 separadas por hrCNE.



Los sueros anti-complejos mostraron una afinidad más heterogénea frente a los distintos antígenos. El suero anti-CxChap reconoció además de la Chaperorina de 60 kDa, la proteína MIP y con una considerable afinidad. El suero anti-CxABR únicamente reconoció la porina PorA y con una intensidad similar a los sueros anti-OMVs. Los sueros anti-CxB, anti-CxBR y anti-CxAB mostraron escasa unión por las proteínas antigénicas y con resultados más confusos. Los sueros anti-CxB y anti-CxBR no reconocieron la porina PorB y muy débilmente una banda a la altura de la porina PorA y otra a la altura de la MIP. En el caso de anti-CxBR, además reconoció una banda de 28 kDa. El suero anti-CxAB detectó débilmente la proteína PorB. Sin embargo, cuando el Western-blotting se realizó contra complejos separados por hrCNE, todos los sueros anti-complejos reconocieron fuertemente los complejos proteicos de porinas, incluidos los sueros anti-CxB, anti-CxBR y anti-CxAB (**figura 16B**).

3.3. Ensayo de actividad bactericida

Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad bactericida de los sueros inmunes anti OMVs y anti-complejos contra la cepa homóloga y las 5 cepas heterólogas se muestran en las **tablas 10 y 11**. Se ha considerado que un suero es bactericida cuando produce la muerte de más del 50% de las bacterias a dilución 1/8. En aquellos sueros que resultaron bactericidas se calculó el título de actividad bactericida, expresado como la máxima dilución que conservó dicha actividad. En aquellos sueros que no resultaron bactericidas, se indica la tasa de mortalidad obtenida a dilución 1/8. Los resultados mostrados son la media de al menos dos experimentos realizados en diferentes días, incluyendo cada uno dos réplicas.

El ensayo resultó muy susceptible a la fuente de complemento utilizada, siendo tóxica en la mayoría de los casos e interfiriendo con la actividad bactericida intrínseca de los sueros. Por ello, para un correcto desarrollo del ensayo, fue necesaria la adsorción de la fuente de complemento comercial resultando el método más efectivo la adsorción con células vivas.

Todos los sueros anti-OMVs (**tabla 10**) resultaron bactericidas frente a la cepa homóloga excepto el suero anti-OMVs PorA-, cuya tasa de mortalidad fue 0%. El suero anti-OMVs PorB- fue el que mostró el mayor título (1/262144). Los tres anti-OMVs sueros restantes (anti-OMVs H44/76, anti-OMVs RmpM- y anti-OMVs FetA-) alcanzaron títulos similares (1/16384 y 1/32768). El grado de reactividad cruzada de los sueros anti-OMVs resultó bajo. El suero anti-OMVs H44/76 fue bactericida contra las cepas heterólogas Nm26 y Nmp27 alcanzando unos títulos de 1/128 y 1/256 respectivamente. El anti-OMVs PorB- fue bactericida contra la cepa 3063 alcanzando un título de 1/8. La cepa 3063 fue la que a mayor número de sueros resultó sensible aunque sólo uno de ellos alcanzó una tasa de mortalidad mayor del 50%.

Los sueros anti-complejos (**tabla 11**) resultaron bactericidas frente a la cepa homóloga, mostrando títulos más bajos que los sueros anti-OMVs, con la excepción del suero anti-CxABR, que mostró una actividad bactericida similar a la mostrada por los sueros anti-OMVs (1/32768). Los siguientes sueros ordenados por título alcanzado fueron anti-CxBR, anti-CxAB (1/512) y anti-CxChap y anti-CxB (1/128). El grado de reactividad cruzada de los sueros anti-complejo resultó también bajo. El suero anti-CxAB fue bactericida contra las cepas Nmp27, alcanzando un título de 1/16.

Tabla 10. Actividad bactericida de los sueros anti-OMVs. Los ratones se inmunizaron con OMVs de la cepa H44/76 o de los mutantes isogénicos PorA-, PorB-, RmpM- o FetA-. Los resultados se expresan como la tasa de mortalidad alcanzada por el suero a dilución 1:8. Cuando la tasa de mortalidad fue mayor del 50% se muestra entre paréntesis la máxima dilución del suero que mantiene una tasa de mortalidad $\geq 50\%$.

Cepa diana	Sueros anti-OMVs				
	anti-OMVs H44/76	anti-OMVs PorA ⁻	anti-OMVs PorB ⁻	anti-OMVs RmpM ⁻	anti-OMVs FetA ⁻
H44/76	100% (1/16384)	0 %	100% (1/262144)	100% (1/16384)	100% (1/32768)
NZ98/254	40,3%	13,9 %	44,5%	5,4%	11,5%
3061	0%	0%	0%	0%	0%
3063	34%	35%	55% (1/8)	45%	0 %
Nm26	100% (1/128)	0%	0%	0%	22,5%
NmP27	100% (1/256)	7%	0%	0%	0%

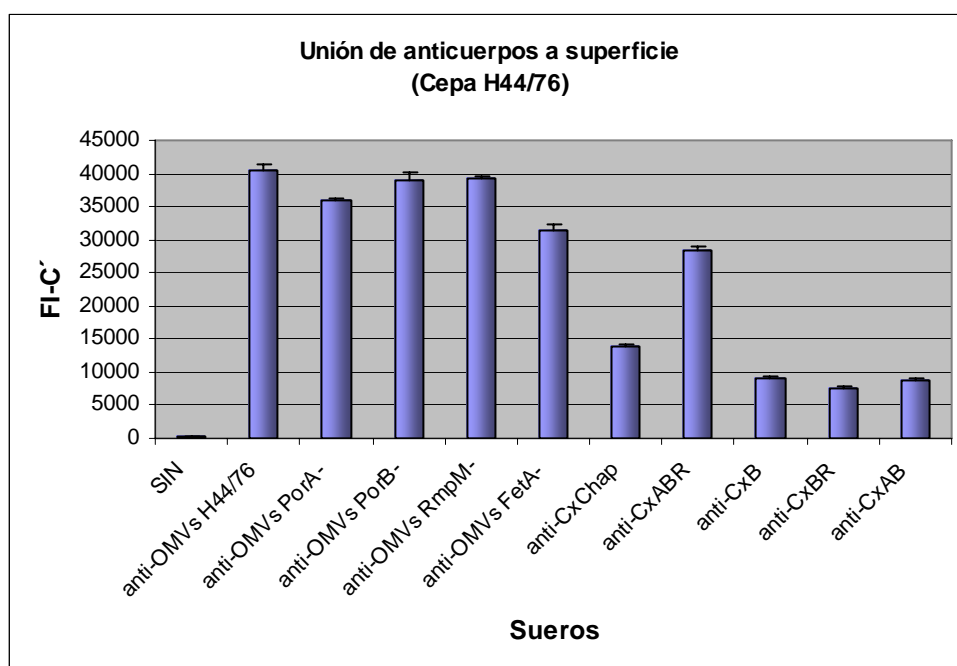
Tabla 11. Titulación de la actividad bactericida de los sueros de ratón anti-complejos. Los ratones se inmunizaron con complejos proteicos de membrana externa de la cepa H44/76 (sueros anti-CxABR y anti-CxB) o de los mutantes isogénicos PorA- (sueros anti-CxChap y anti-CxBR) y RmpM- (sueros anti-CxAB). Los resultados se expresan como la tasa de mortalidad alcanzada por el suero a dilución 1:8. Cuando la tasa de mortalidad fue mayor del 50% se muestra entre paréntesis la máxima dilución del suero que mantiene dicha tasa de mortalidad.

Cepa diana	Sueros anti-complejos				
	anti-CxChap	anti-CxABR	anti-CxB	anti-CxBR-	anti-CxAB
H44/76	100% (1/128)	100% (1/32768)	100% (1/128)	100% (1/512)	100% (1/512)
NZ98/254	15%	0%	0%	1%	3,5%
3061	0%	0%	0%	0%	0%
3063	47 %	43 %	8 %	26%	20%
Nm26	11,5%	0%	0%	1%	14,3%
NmP27	0%	0%	18,4%	0%	54% (1/16)

3.4. Unión de anticuerpos a superficie

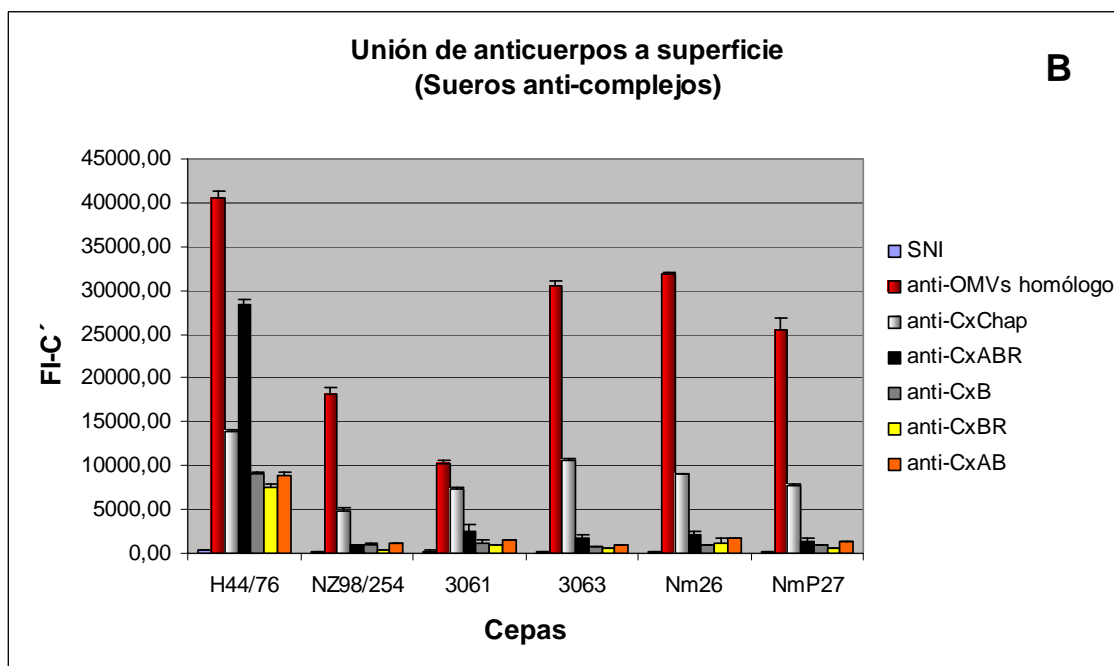
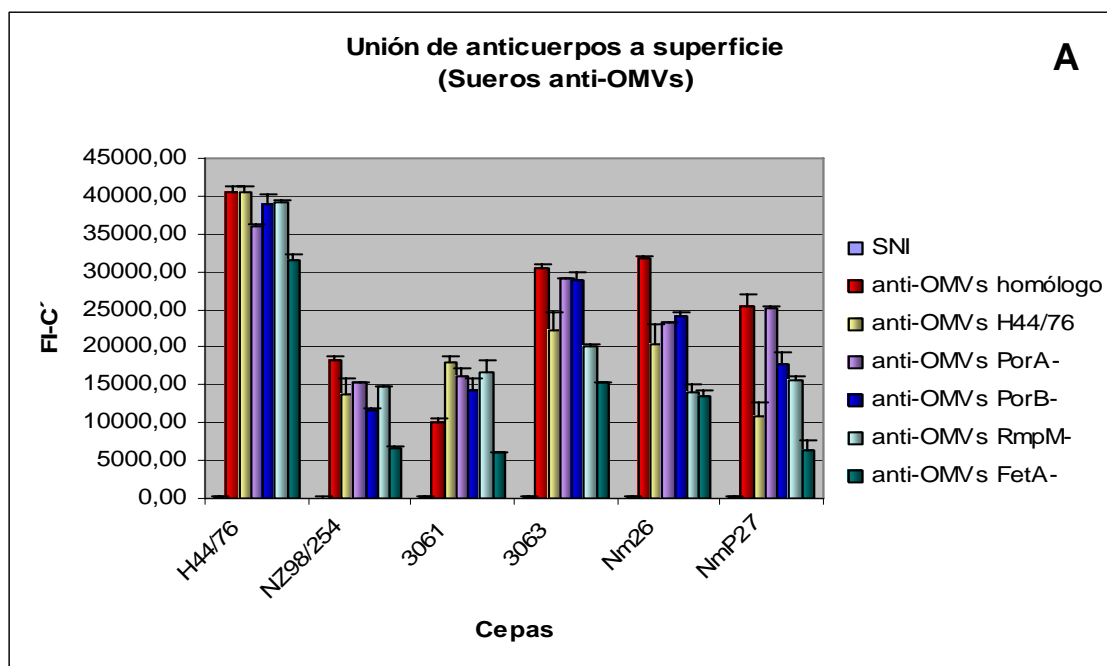
El reconocimiento de epitopos en la superficie bacteriana de la cepa homóloga H44/76 y de las seis cepas heterólogas empleadas, por parte de los anticuerpos presentes en cada uno de los sueros obtenidos, se determinó por citometría de flujo mediante el ensayo de unión a superficie. Este ensayo determina la unión total de anticuerpos a la superficie a través de la unión de un anticuerpo secundario fluorescente a los anticuerpos unidos a la superficie bacteriana. Los resultados se muestran en las **figuras 17 y 18** como índices de fluorescencia alcanzados por cada cepa y suero a los que se les sustrajo el índice de fluorescencia generado por el control sin anticuerpos y con fuente de complemento (FI-C'). En la **figura 17** se representa el reconocimiento de epitopos en la superficie bacteriana de la cepa H44/76 por los sueros homólogos anti-OMVs H44/76, anti-OMVs mutantes y anti-complejos. Los sueros inmunes que mostraron una mayor unión a epitopos de la cepa homóloga fueron los sueros anti-OMVs, sin que se observasen grandes diferencias entre ellos, alcanzando valores de FI-C' 100 veces mayores que el suero no inmune ($P < 0,0001$). Los sueros anti-complejo mostraron una unión total de anticuerpos notablemente menor que los sueros anti-OMVs, con la excepción de sueros anti-CxABR donde los valores alcanzados fueron similares a los sueros anti-OMVs, siendo en cualquier caso mayores que el suero no inmune ($P < 0,0001$).

Figura 17. Unión total de anticuerpos de los sueros anti-OMVs y anti-complejo a la superficie bacteriana de la cepa homóloga H44/76, así como el suero no inmune como control negativo. La unión de anticuerpos se muestra como índice fluorescencia medio de 7 500 células bacterianas menos la fluorescencia obtenida con el control negativo que incluía únicamente fuente de completo (FI-C').



La **figura 18** muestra el reconocimiento de epitopos en la superficie de las bacterias de las cepas homólogas y heterólogas por los sueros anti-OMVs y anti-complejos. La reactividad cruzada que mostraron los sueros anti-OMVs (**figura 18A**) fue heterogénea y dependiente de la cepa diana, mostrando muchos casos una alta unión a epitopos en la superficie bacteriana de cepas heterólogas, similares a los valores alcanzados por los sueros homólogas para cada cepa. Sin embargo, no se observó ningún patrón de unión entre los sueros anti-OMVs mutantes en las distintas cepas, con la excepción del suero anti-OMVs FetA-, que fue el que menor unión de anticuerpos a superficie mostró contra todas las cepas.

Figura 18. Unión total de anticuerpos de los sueros anti-OMVs (A) y anti-complejos (B) a la superficie bacteriana de la cepa homóloga H44/76 y al panel de cepas heterólogas. La unión de anticuerpos se muestra como índice fluorescencia medio de 7500 células bacterianas menos la fluorescencia obtenida con el control negativo sin anticuerpos y con fuente de completo (FI-C').



El suero anti-OMVs PorA- fue el suero anti-OMVs que mostró un mayor grado de reactividad cruzada, consiguiendo un mayor índice de fluorescencia absoluto en tres de las cinco cepas heterólogas (NZ98/254, 3063 y NmP27) y resultando estos valores muy próximos o mayores al obtenido por los sueros homólogos en todas la cepas.

La unión que mostraron los sueros anti-complejos (**figura 18 B**) fue sensiblemente menor respecto a los sueros anti-OMVs y los controles positivos de cada cepa. A pesar de que el suero anti-CxABR fue, con diferencia, el suero anti-complejos que mostró mayor afinidad de los anticuerpos por las células de la cepa homólogas, el suero anti-Chap resultó ser el que mostró mayor afinidad por las cepas heterólogas, uniéndose a todas ellas entre un 26% y un 72% de la alcanzada por los respectivos sueros homólogos.

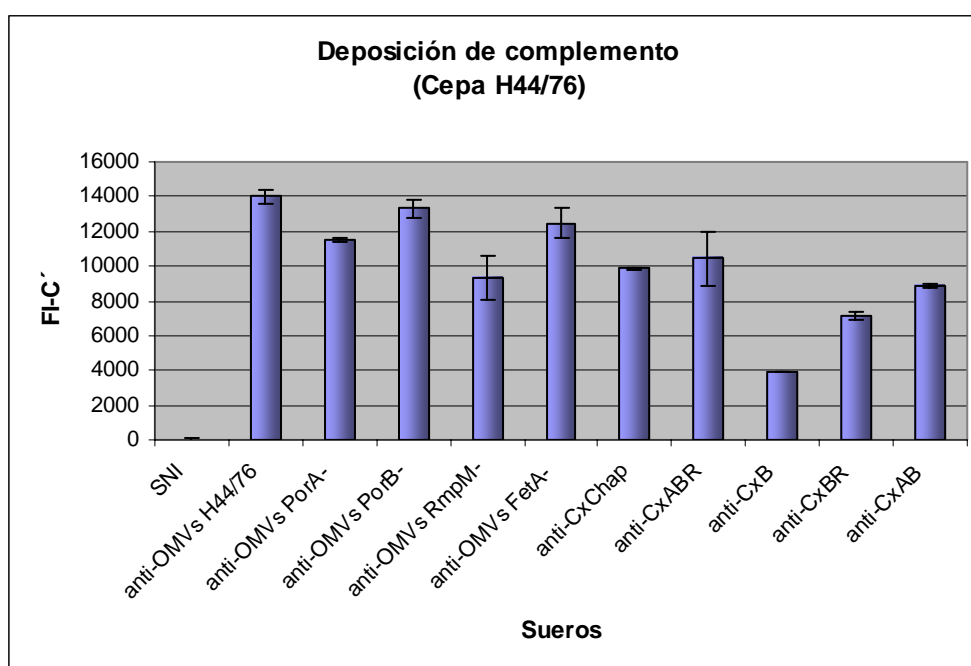
3.5. Deposición de complemento

La deposición de complemento en la superficie bacteriana inducida por los anticuerpos presentes en cada uno de los sueros obtenidos (vía clásica de activación del complemento), se determinó por citometría de flujo mediante el ensayo de deposición de complemento. Este ensayo determina la deposición de complemento en la superficie bacteriana a través de la unión de un anticuerpo marcado con fluorescencia específico contra C3b. Los resultados se muestran como índices de fluorescencia (FI) a los que se le sustrajo la fluorescencia generada por el control negativo sin anticuerpos y con complemento (FI-C').

Los resultados obtenidos con los sueros anti-OMVs mutantes y los sueros anti-complejo frente a la cepa homóloga H44/76 se muestran en la **figura 19**. Los sueros anti-OMVs mutantes, así como el control positivo

(anti-OMVs H44/76), indujeron positivamente la deposición de complemento si lo comparamos con el suero no inmune ($P<0,0001$). Las diferencias entre ellos fueron pequeñas, siendo los sueros anti-OMVs PorA- y anti-OMVs RmpM- los que consiguieron un menor índice de deposición de complemento.

Figura 19. Deposición de complemento en la superficie bacteriana de la cepa H44/76, inducida por anticuerpos de los sueros homólogos anti-OMVs y anti-complejos. La unión de anticuerpos se muestra como índice fluorescencia medio de 7 500 células bacterianas menos la fluorescencia obtenida con el control negativo sin anticuerpos y con complemento (FI-C').

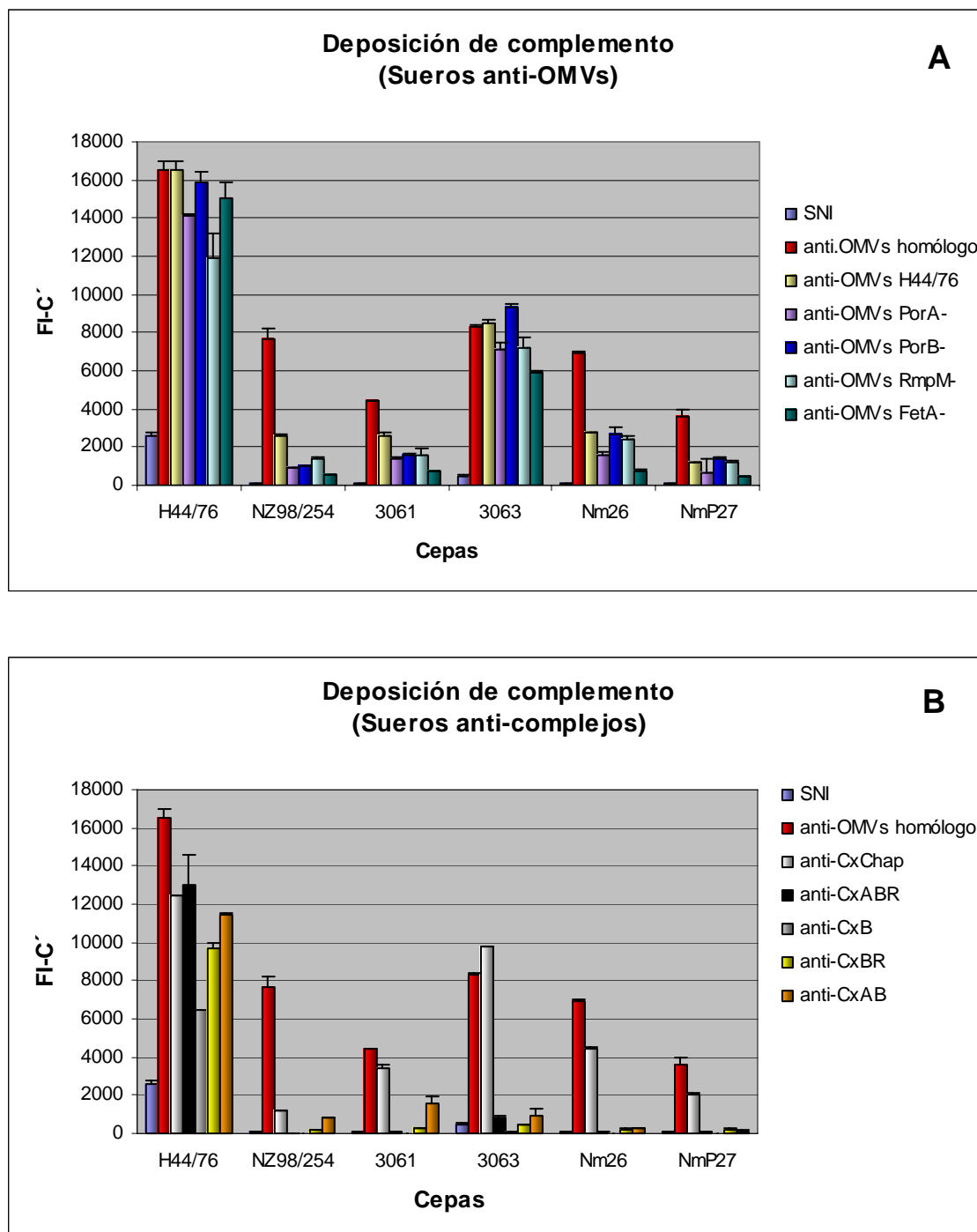


Por su parte, en los sueros anti-complejos se observó que la deposición de complemento fue menor, si bien los sueros anti-Chap y anti-CxABR alcanzaron valores equiparables a los obtenidos por los sueros anti-OMVs.

Cuando el ensayo se realizó con las cepas heterólogas (**figura 20**), la inducción de la deposición de complemento dependió más de la cepa diana que del tipo de suero, siendo el suero anti-CxChap el que mayor reactividad cruzada mostró. Los sueros anti-OMVs (**figura 20A**) indujeron una deposición significativamente menor que los controles positivos sin alcanzar, en la mayoría de los casos, el 50% de la FI del control positivo, si bien siempre mayor que la correspondiente al suero no inmune ($P < 0,0001$). Únicamente en la cepa 3063 los valores de FI fueron similares a los obtenidos con el control positivo.

La deposición de complemento inducida por los sueros anti-complejos (**figura 20B**) con las cepas heterólogas fue prácticamente nula, similar a la conseguida por el suero no inmune, a excepción del suero anti-CxChap que mostró una excelente reactividad cruzada alcanzando valores de FI-C' entre el 50 y 110% de los sueros homólogos en 5 de las 6 cepas heterólogas.

Figura 20. Deposición de complemento en la superficie bacteriana de la cepa H44/76 y cepas heterólogas, inducida por los sueros anti-OMVs (A) y anti-complejos (B). La deposición de complemento se muestra como índice fluorescencia medio de 7 500 células bacterianas menos la fluorescencia obtenida con el control negativo sin anticuerpos y con complemento.

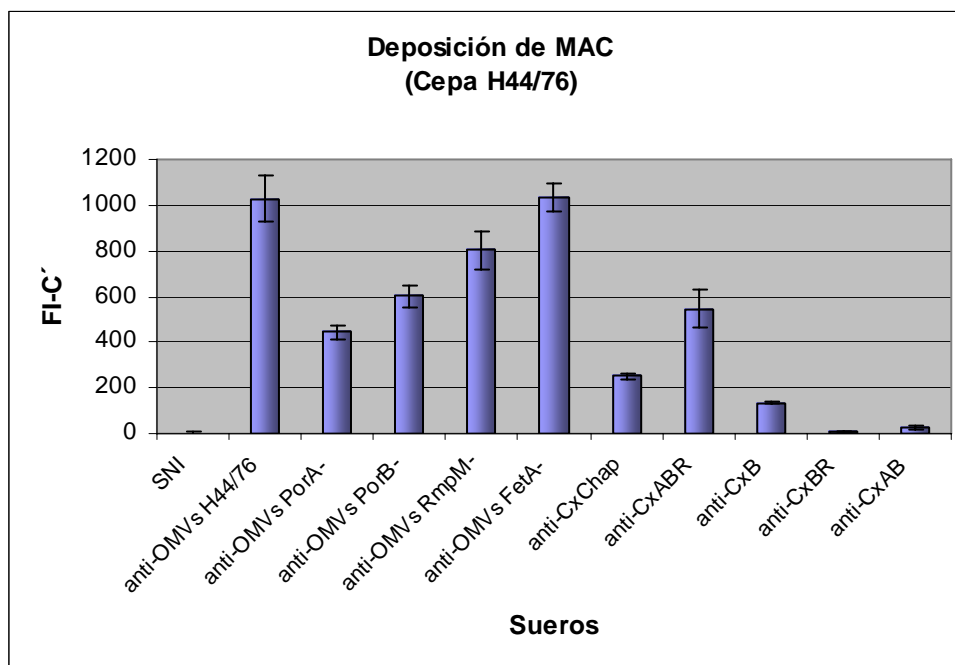


3.6. Deposición de MAC

La deposición del complejo de ataque a membrana (MAC) en la superficie bacteriana se determinó por citometría de flujo mediante el ensayo de deposición de complemento. Este ensayo determina la deposición de complemento en la superficie bacteriana a través de la unión de un anticuerpo marcado con fluorescencia al complejo de ataque a membrana (C5-C9) en la superficie bacteriana. Los resultados se muestran como índices de fluorescencia (FI) a los que se le sustrajo la fluorescencia generada por el control negativo sin anticuerpos y con complemento (FI-C').

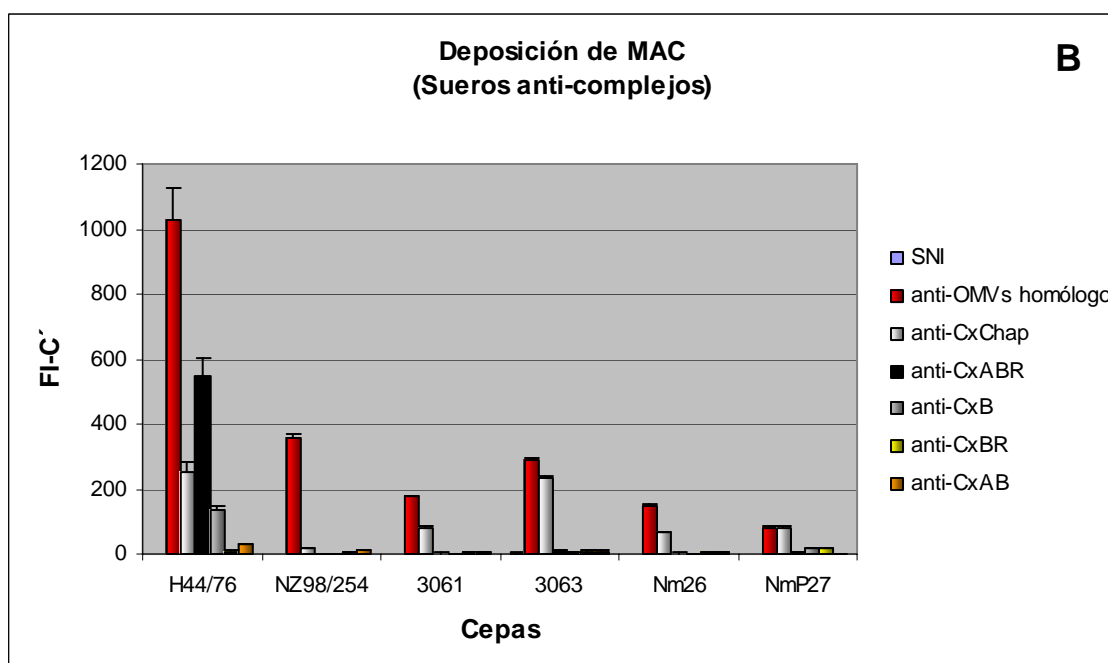
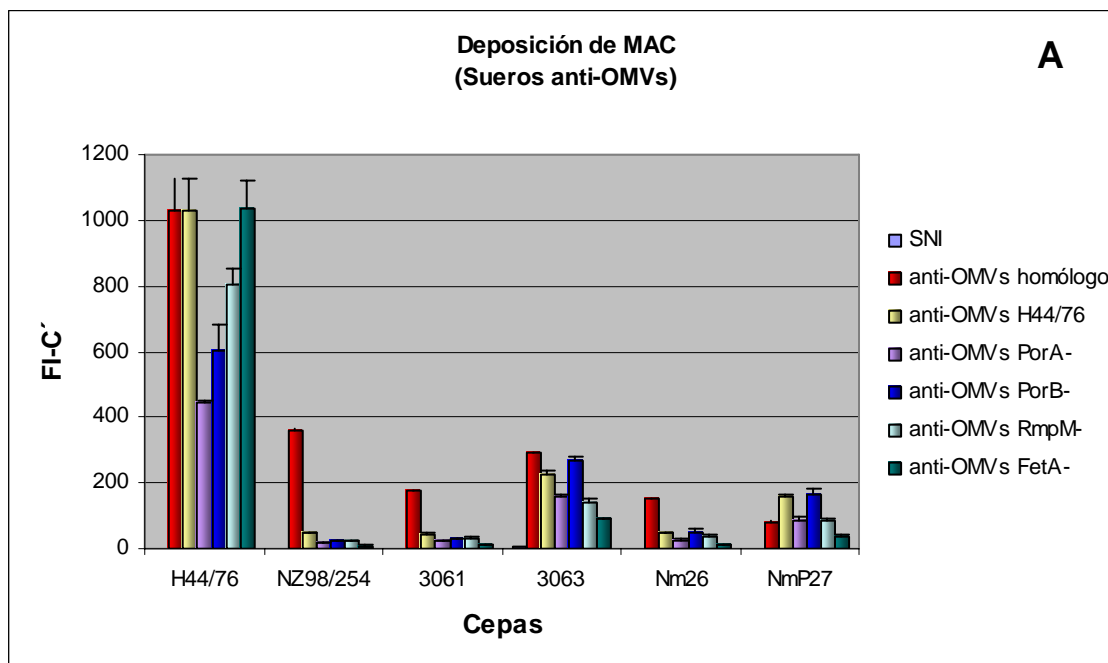
Los resultados obtenidos con los sueros anti-OMVs mutantes y los sueros anti-complejo frente a la cepa homóloga H44/76 se muestran en la **figura 21**. Los sueros anti-OMVs mutantes, así como el control positivo (anti-OMVs H44/76), indujeron la deposición del MAC respecto al suero no inmune ($P < 0,0001$). Las diferencias entre ellos fueron importantes, siendo los sueros anti-OMVs PorA-, anti-OMVs PorB- y anti-OMVs RmpM- los que indujeron un menor índice de deposición de MAC. El suero anti-OMVs FetA- mostró la misma deposición de MAC que el control positivo (anti-OMVs H44/76). Los sueros anti-complejos mostraron una menor deposición que los sueros anti-OMVs, donde anti-CxBR y anti-CxAB mostraron valores similares al suero no inmune.

Figura 21. Deposición de MAC en la superficie bacteriana de la cepa H44/76, inducida por anticuerpos de los sueros homólogos anti-OMVs y anti-complejos. La unión de anticuerpos se muestra como índice fluorescencia medio de 7 500 células bacterianas menos la fluorescencia obtenida con el control negativo sin anticuerpos y con complemento (FI-C').



La deposición de MAC en la superficie de las cepas heterólogas se muestra en la **figura 22**. La deposición de MAC inducida por los sueros anti-OMVs (**figura 23A**) varió en gran medida según la cepa heteróloga, siendo en las cepas 3063 y NmP27 donde mayor grado de reactividad cruzada se observó, donde la deposición fue equiparable a los respectivos controles positivos. En las cepas restantes, NZ98/254, 3061 y NmP27, la deposición de MAC fue baja, próxima al suero no inmune. Por su parte, el único suero anti-complejos capaz de inducir la deposición de MAC en las cepas heterólogas fue el suero anti-CxChap, el cual indujo la deposición en cuatro de las cinco cepas heterólogas, alcanzando contra dos de ellas valores similares a los de sus respectivos sueros anti-OMVs homólogos.

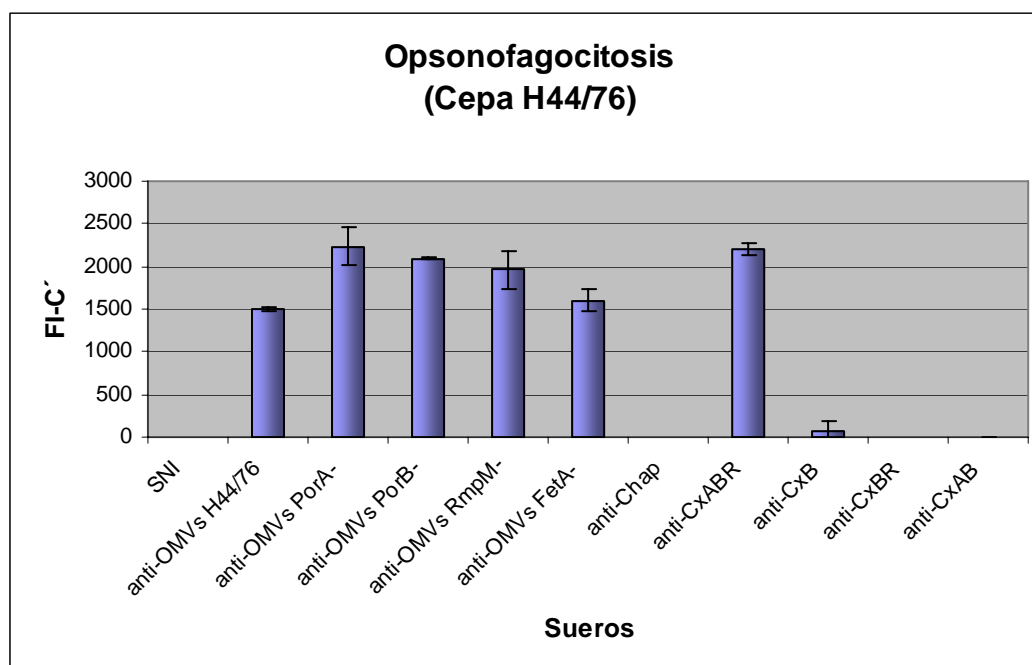
Figura 22. Deposición de MAC en la superficie bacteriana de la cepa H44/76 y cepas heterólogas, inducida por los sueros anti-OMVs (A) y anti-complejos (B). La deposición de complemento se muestra como índice fluorescencia medio de 7 500 células bacterianas menos la fluorescencia obtenida con el control negativo sin anticuerpos y con complemento.



3.7. Opsonofagocitosis

La fagocitosis inducida por los anticuerpos de los sueros inmunes se determinó por citometría de flujo mediante el ensayo de opsonofagocitosis (OPA, *Opsonophagocytosis Assay*), en el que se determina la fluorescencia emitida por las células fagocíticas a consecuencia de la internalización por fagocitosis de meningococos teñidos con fluorocromos. Los resultados se muestran como índices de fluorescencia (FI) a los que se le resta la fluorescencia generada por el control sin anticuerpos y con complemento y (FI-C').

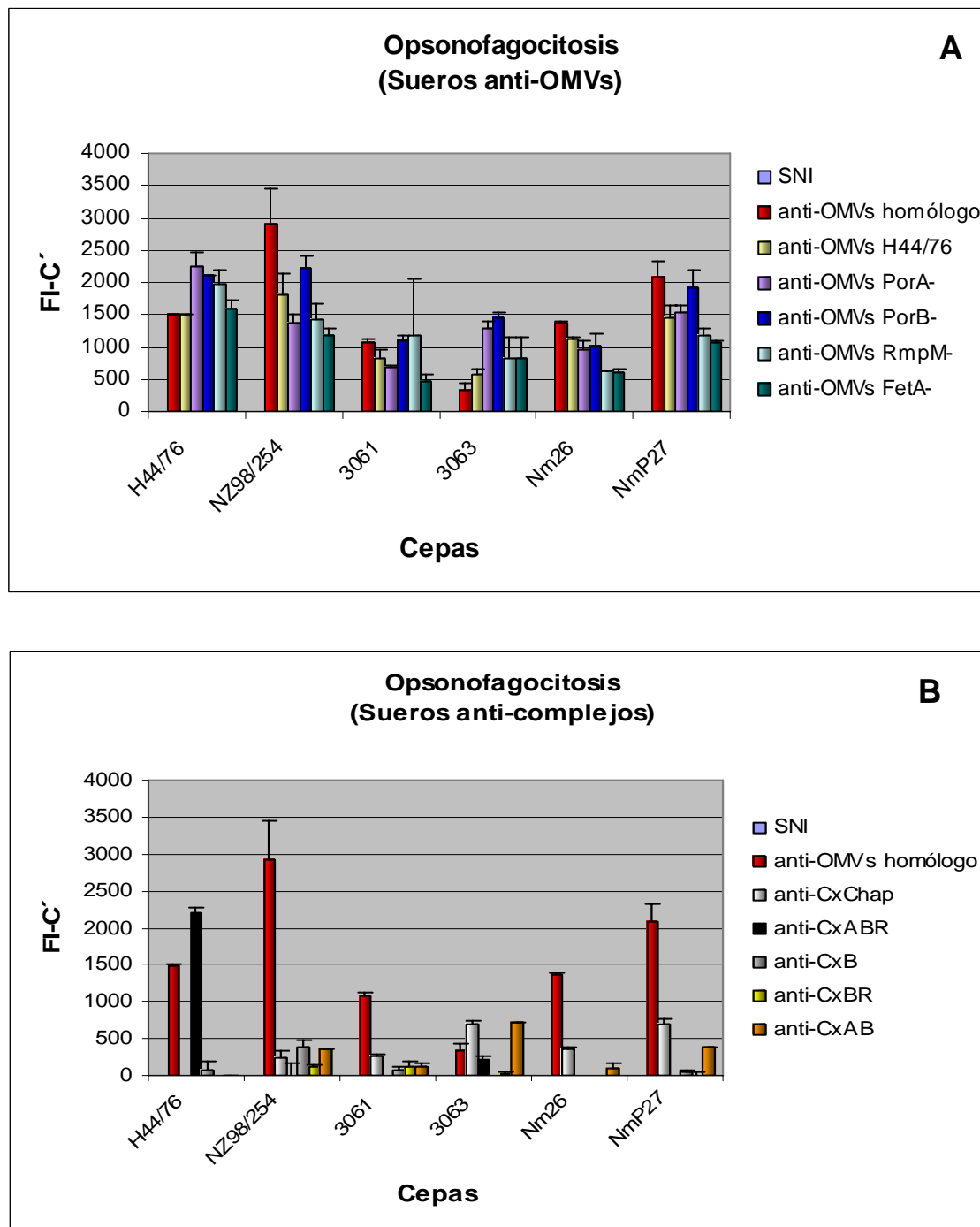
Figura 23. Opsonofagocitosis de la cepa H44/76 inducida por los sueros anti-OMVs y anti-complejos. La opsonofagocitosis se muestra como índice fluorescencia medio de 7 500 células fagocíticas menos la fluorescencia obtenida con el control negativo sin anticuerpos y con complemento.



Los resultados obtenidos con los sueros anti-OMVs mutantes y los sueros anti-complejos frente a la cepa homóloga H44/76 se muestran en la **figura 23**. Los sueros anti-OMVs indujeron la fagocitosis del meningococo respecto al suero no inmune ($P < 0,0001$). Los sueros anti-OMVs mutantes consiguieron valores de FI-C' mayores que el control positivo, alcanzando un incremento de los valores de entre un 7% y un 50%, siendo el suero anti-OMVs PorA- el que mayor fagocitosis indujo. Por su parte, los sueros anti-complejo mostraron una importante reducción en la inducción de la fagocitosis, resultando el suero anti-CxABR el único que obtuvo valores positivos, siendo éstos comparables a los sueros anti-OMVs.

En la **figura 24** se muestra la opsonofagocitosis de células de las cepas heterólogas. Los histogramas indican una alta reactividad cruzada de los sueros anti-OMVs (**figura 24A**), donde todos los sueros inmunes indujeron la opsonofagocitosis de todas las cepas ($P < 0,0001$). La fagocitosis inducida por los sueros homólogos a cada cepa varió en gran medida según la cepa test, siendo la diferencia entre el mayor y menor valor de FI-C' obtenido hasta en un factor de 10. Los valores de FI-C' obtenidos para los sueros anti-OMVs H44/76 y anti-OMVs mutantes fueron heterogéneos respecto al control positivo según la cepa, resultando en algún caso, como la cepa 3063, superiores al propio suero homólogo. Los sueros anti-complejo (**figura 24B**), por el contrario, no indujeron la opsonofagocitosis de todas las cepas. Los sueros anti-CxChap y anti-CxAB, a pesar de no inducir la opsonofagocitosis de la cepa homóloga, si la indujeron en las cepas heterólogas, si bien ésta varió respecto al control positivo de cada cepa, resultando entre un 10 y un 210% del suero homólogo de las cepas NZ98/254 y 3063 respectivamente, en el caso del suero anti-CxChap, y entre un 12 y un 212% en el caso del suero anti-CxAB. El suero anti-CxABR únicamente indujo la opsonofagocitosis de la cepa 3063, siendo el que mayor opsonofagocitosis indujo en su cepa homóloga, y casi de manera única.

Figura 24. Opsonofagocitosis inducida por anticuerpos de la cepa H44/76 y cepas heterólogas, inducida por los sueros anti-OMVs (A) y anti-complejos (B). La deposición de complemento se muestra como índice fluorescencia medio de 7 500 células fagocíticas menos la fluorescencia obtenida con el control negativo que incluía fuente de completo sin anticuerpos.



DISCUSIÓN

Tras el fracaso que supuso el polisacárido capsular como antígeno vacunal frente al serogrupo B, los antígenos subcapsulares como las proteínas de membrana externa se han convertido en los principales candidatos vacunales contra este serogrupo, presentadas bien como proteínas recombinantes purificadas o bien como proteínas incluidas en OMVs¹¹³. Estas estrategias, sin embargo, no están exentas de inconvenientes. Por un lado, la utilización de OMVs como vehículo presentador de antígenos conlleva el enmascaramiento de posibles antígenos protectores debido a la presencia de otros inmunodominantes variables, como la PorA o las Opas^{238,239}, y por otro lado, la obtención de proteínas por técnicas de ADN recombinante puede conllevar la pérdida de epitopos conformacionales, tanto por una incorrecta renaturalización²⁴⁰ como por no formar las asociaciones con otras proteínas que ocurrirían en la célula en condiciones normales²⁴¹. De hecho, las proteínas recombinantes estudiadas hasta la fecha, aún reuniendo las características necesarias para ser un buen candidato vacunal, no han alcanzado todavía la eficacia deseada, si bien los avances en la última década han sido importantes¹¹³.

En el presente capítulo se analizó la capacidad antigénica y la respuesta generada por la inmunización de animales de experimentación con complejos proteicos de membrana externa purificados, así como el efecto en la respuesta frente a OMVs deficientes en alguna de las proteínas componentes de los principales complejos proteicos.

²³⁸ **Novotny LA, Bakaletz LO.** The fourth surface-exposed region of the outer membrane protein P5-homologous adhesin of nontypable *Haemophilus influenzae* is an immunodominant but nonprotective decoying epitope. *J Immunol.* 2003; 171: 1978-1983.

²³⁹ **Wiertz EJ, Delvig A, Donders EM, Brugghe HF, van Unen LM et al.** T-cell responses to outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*: comparative study of the Opa, Opc, and PorA proteins. *Infect Immun.* 1996; 64: 298-304.

²⁴⁰ **Georgousakis MM, Hofmann A, Batzloff MR, McMillan DJ, Sriprakah KS.** Structural optimisation of a conformational epitope improves antigenicity when expressed as a recombinant fusion protein. *Vaccine.* 2009; 27: 6799-6806.

²⁴¹ **Sadler K, Zhang Y, Xu J, Yu Q, Tam JP.** Quaternary protein mimetics of gp41 elicit neutralizing antibodies against HIV fusion-active intermediate state. *Biopolymers.* 2008; 90: 320-329.

En el estudio del complexoma de membrana externa, tratado en el capítulo anterior, hemos observado que los complejos proteicos más abundantes y consistentes de la membrana externa del meningococo fueron aquellos formados por porinas, entre los cuales se encontraron homómeros de PorB, homómeros de PorA y cuatro tipos de asociaciones diferentes: PorA/PorB/RmpM/MIP, PorA/PorB/RmpM, PorA/PorB, PorB/RmpM. Además, también se detectaron otros tres complejos cuantitativamente importantes: el complejo de la chaperonina de 60 kDa, el complejo de glutamina sintetasa y el complejo de cetol-ácido reductoisomerasa. De entre todos estos, los complejos seleccionados para la inmunización de ratones fueron las asociaciones de porinas PorA/PorB/RmpM, PorA/PorB, PorB/RmpM y homómeros de PorB, así como el complejo formado por la chaperonina de 60 kDa. Los complejos de porinas que no contenían la porina PorA (PorB/RmpM y homómeros de PorB) fueron seleccionados para estudiar la antigenicidad de los complejos de porinas sin la interferencia de la inmunodominante PorA. Los complejos PorA/PorB/RmpM y PorA/PorB, a pesar de que sí contienen la PorA, también fueron purificados ante la posibilidad de que la estructura cuaternaria pudiese presentar epitopos conformacionales protectivos y conservados. En el caso del complejo de la chaperonina de 60 kDa, su secuencia conservada y el carácter antigénico de esta proteína, comprobado en trabajos previos en nuestro laboratorio¹²⁰, así como por otros investigadores²¹¹, la convirtieron en un buen candidato a estudiar.

Uno de los principales problemas que conlleva el estudio de cualquier proteína, es la obtención de una cantidad de muestra suficiente para llevar a cabo los subsiguientes análisis. El trabajo con complejos proteicos dificulta aún más este proceso debido a la restricción en el uso de técnicas agresivas para su purificación y concentración, ya que éstas pueden provocar la desestabilización de los complejos. Por ello, para la purificación se optó la elución pasiva a partir de gel ya que es un método sencillo que permite mantener los complejos proteicos en unas condiciones de solubilidad, pH, fuerza iónica y temperatura no desnaturizantes, idénticas a las sufridas durante su separación en gel, minimizando de este modo las condiciones que

podiesen alterar estas estructuras durante el proceso de purificación. La elución pasiva de proteínas a partir de gel fue previamente utilizada en nuestro laboratorio obteniendo buenos resultados²⁴² y ampliamente recurrida en la literatura^{243,244} especialmente cuando se trabaja con pequeñas cantidades de proteína.

El principal inconveniente encontrado en la purificación de los complejos proteicos fue la dificultad de aislar los complejos de porinas de forma individual. Ante esta dificultad, con la excepción del complejo de la chaperonina y el homómero de PorB, se optó por purificar conjuntos de complejos, utilizando para ello las cepas mutantes con el fin de obtener los complejos deseados. La comprobación por hrCNE y tinción con CBB de los eluidos obtenidos mostró la correcta elución de los complejos de interés, mientras que la comprobación por SDS-PAGE y tinción de plata mostró una composición proteica de los eluidos coherente con la composición de los complejos ya discutida en el capítulo I.

Paralelamente a la obtención de los sueros anti-complejo, los sueros anti-OMVs de las cepas mutantes defectivas en las proteínas PorA, PorB, RmpM y FetA nos permitió estudiar las consecuencias de la eliminación de uno de los componentes de los principales complejos de membrana externa en la respuesta inmune generada.

La caracterización por Western-blotting de los sueros anti-OMVs puso de manifiesto el número limitado de proteínas inmunogénicas ya que ninguno de ellos reconoció más de 12 antígenos. Una de las principales consecuencias observadas en los sueros anti-OMVs mutantes fue el aumento de la respuesta contra la porina PorB en los sueros anti-OMVs PorA- y anti-OMVs RmpM-. Como vimos en el capítulo I, estas dos proteínas, PorA y RmpM, se asocian con la PorB para formar complejos

²⁴² Arenas J, Abel A, Sánchez S, Alcalá B, Criado MT *et al.* Locus NMB0035 codes for a 47-kDa surface-accessible conserved antigen in *Neisseria*. *Int Microbiol.* 2006; 9: 273-280.

²⁴³ Burgess RR. Elution of proteins from gels. *Methods Enzymol.* 2009; 463: 565-572.

²⁴⁴ Seelert H, Krause F. Preparative isolation of protein complexes and other bioparticles by elution from polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 2008; 29: 2617-2636.

proteicos, por lo que su ausencia podría permitir la exposición de nuevos epitopos de PorB, o una mayor accesibilidad explicando así el aumento de anticuerpos contra esta proteína.

Una de las proteínas más antigénicas fue la proteína MIP, la cual fue reconocida fuertemente en el Western-blotting a partir de SDS-PAGE por todos los sueros anti-OMVs y por el suero anti-CxChap. En el caso concreto del suero anti-CxChap, llamó la atención este reconocimiento, ya que en la comprobación por SDS-PAGE del eluido utilizado para la obtención de este suero, únicamente se detectó una banda y ésta se correspondía con el peso molecular de la chaperonina de 60 kDa. Es posible que en el proceso de purificación del complejo de la chaperonina se hubiese producido una cierta contaminación con la MIP, generando anticuerpos contra ella al inmunizar los ratones con dicho eluido. Dada su alta inmunogenicidad, resultó fuertemente reconocida en el Western-blot.

Los ensayos de Western-blotting realizados con los sueros anti-complejos revelaron que la mayor parte de los anticuerpos generados contra los complejos de porinas reconocen epitopos conformacionales. Cuando el Western-blotting se realizó contra proteínas separadas por SDS-PAGE, los sueros anti-CxBR, anti-CxAB y anti-CxB apenas reconocieron los antígenos, ninguno reconoció la PorB, y la PorA fue reconocida débilmente por anti-CxBR y anti-CxB (posiblemente debido a epitopos comunes con la PorB, ya detectados en trabajos previos²⁴⁵). Sin embargo, cuando el Western-blotting se realizó contra los complejos nativos separados por hrCNE, los tres sueros reconocieron fuertemente los complejos de porinas evidenciando la naturaleza conformacional de los epitopos reconocidos. Este resultado muestra una carencia de la metodología de detección de antígenos basada en el ensayo Western-blotting a partir de 2-D clásica (IEF/SDS-PAGE), ya que en él únicamente se

²⁴⁵ **Sánchez S, Abel A, Marzoa J, Gorringe A, Criado T, Ferreirós CM.** Characterisation and immune responses to meningococcal recombinant porin complexes incorporated into liposomes. *Vaccine*. 2009; 27: 5338-5343.

reconocen epitopos lineales, perdiendo información sobre antígenos que únicamente son reconocidos cuando conservan su correcta conformación.

El indicador aceptado internacionalmente como correlación de protección es un título de actividad bactericida del suero ≥ 4 con suero humano, y ≥ 8 con suero de conejo²⁴⁶, basado en observaciones con el serogrupo C. Para la enfermedad del serogrupo B, sin embargo, los datos son menos firmes y existen dudas sobre la necesidad de alcanzar este umbral²⁴⁷, aunque actualmente sigue siendo un requisito necesario para la concesión de las licencias de producción de vacunas antimeningocócicas. Este requerimiento se basa principalmente en la correlación observada con los preparados vacunales de OMVs entre los títulos de actividad bactericida del suero ≥ 4 alcanzados tras la inmunización y la eficacia clínica de la vacuna²²¹.

Actualmente se están contemplando otras vías de actuación del sistema inmune como indicadores de protección, como la opsonofagocitosis y la deposición de complemento en la superficie bacteriana³⁸. Por ello, en este trabajo se estudiaron las características antigénicas de los principales complejos proteicos de membrana externa, así como de OMVs mutantes, a través de ensayos de actividad bactericida del suero, de deposición de complemento en la membrana bacteriana (C3b y MAC) y de inducción de opsonofagocitosis.

La realización del ensayo de actividad bactericida estuvo condicionada por la fuente de complemento exógena disponible en nuestro laboratorio. En los últimos congresos internacionales sobre *Neisserias* patógenas, se ha mostrado un creciente interés por la utilización de complemento humano agammaglobulémico en la realización de estudios clínicos de efectividad, debido especialmente a la alta

²⁴⁶ **Feavers I.** Choosing isolates for the evaluation of meningococcal protein vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2009; 8: 1461-1463.

²⁴⁷ **Granoff DM.** Relative importance of complement-mediated bactericidal and opsonic activity for protection against meningococcal disease. *Vaccine*. 2009; 27: 117-125.

especificidad del regulador negativo del complemento humano fH por su receptor fHbp en la superficie bacteriana, y del que el meningococo se sirve para aumentar su supervivencia en el suero²⁴⁶. Ante las dificultades para obtener complemento humano agammaglobulémico en la fecha de realización de los ensayos de actividad bactericida, se empleó suero de cría de conejo comercial, ampliamente utilizado en la bibliografía revisada²¹⁷, si bien los títulos de actividad bactericida se ven incrementados por la inespecificidad del fH de conejo por la fHbp del meningococo²⁴⁸. Posteriormente, gracias a la colaboración con el *Health Protection Agency* (Reino Unido) dispusimos de sueros humanos agammaglobulémicos con los que se realizaron todos los ensayos de citometría de flujo.

Los resultados de actividad bactericida de los sueros anti-OMVs frente a la cepa homóloga resaltaron la importancia de la PorA como antígeno inmunodominante generador de anticuerpos bactericidas, al resultar bactericidas todos los sueros anti-OMVs, salvo el suero anti-OMVs PorA-. La eliminación de proteínas de los complejos proteicos de porinas en las OMVs, como la PorB y la RmpM, no tuvo consecuencias en la capacidad bactericida de los respectivos sueros frente a la cepa homóloga (anti-OMVs PorB- y anti-OMVs RmpM-), alcanzando títulos similares al suero anti-OMVs salvaje, aunque sí contra las cepas heterólogas, como veremos a continuación.

Cuando el ensayo se realizó contra las cepas heterólogas, la actividad lítica de los sueros bactericidas se redujo considerablemente, siendo el anti-OMVs H44/76 el que mantuvo su actividad bactericida contra más cepas heterólogas (40%). Este suero resultó bactericida contra aquellas cepas que compartieron el epitopo P1.16 (cepas Nm26 y NmP27), señalando su importancia como epitopo generador de anticuerpos bactericidas. Esto concuerda con la alta especificidad de cepa de la respuesta contra

²⁴⁸ **Granoff DM, Welsch JA, Ram S.** Binding of complement factor H (fH) to *Neisseria meningitidis* is specific for human fH and inhibits complement activation by rat and rabbit sera. *Infect Immun.* 2009; 77: 764-769.

la proteína PorA, y coincide con observaciones previas de otros autores sobre el epitopo P1.16 como generador de anticuerpos bactericidas²⁴⁹. Sin embargo, los sueros anti-OMVs PorB-, anti-OMVs RmpM- y anti-OMVs FetA- no resultaron bactericidas contra esas mismas cepas a pesar de que estos sueros contienen anticuerpos contra la misma PorA. Este resultado sugiere que la ausencia de las proteínas PorB, RmpM o FetA podría alterar el epitopo P1.16 en las OMVs utilizadas para la inmunización, y por lo tanto no generar anticuerpos contra él en dichos sueros. Como vimos en el capítulo I, la ausencia de PorB y RmpM modificaba el perfil de complejos de porinas, lo que conlleva una pérdida de epitopos, pudiendo estar entre ellos el P1.16. En el caso del suero anti-OMVs FetA-, la ausencia de esta proteína no afectó a la composición de los complejos de porinas (capítulo I), por lo que su ausencia no debería afectar a la conformación de la PorA y de los complejos en los que ésta se encuentra. Sin embargo, aunque en los experimentos realizados para este trabajo no lo hayan podido comprobar, la asociación de FetA- a complejos no se puede descartar. Este resultado apoya la importancia del complejo proteico como fuente de epitopos protectivos, aunque en este caso mostraron restricción de cepa.

Por su parte, los sueros anti-complejos resultaron bactericidas contra la cepa homóloga, mostrando su carácter inmunogénico y la capacidad bactericida de los anticuerpos generados, incluso en aquellos sin anticuerpos específicos contra la PorA. Sin embargo, esta capacidad bactericida dependió del modo de presentación; los complejos inmunogénicos CxChap, CxBR y CxB también están presentes en la OMVs de la cepa mutante sin PorA, pero curiosamente el suero inmune contra las OMVs de esta cepa, como ya vimos, no resultó bactericida. Esto podría ser debido a que la presentación del antígeno en forma de complejos solubles fuera de la

²⁴⁹ **Michaelsen TE, Kolberg J, Aase A, Herstad TK, Høiby EA.** The four mouse IgG isotypes differ extensively in bactericidal and opsonophagocytic activity when reacting with the P1.16 epitope on the outer membrane PorA protein of *Neisseria meningitidis*. *Scand J Immunol.* 2004; 59: 34-39.

membrana resulta más eficaz que incluidos en la vesículas, donde los LOS u otras moléculas podrían entorpecer su accesibilidad y reconocimiento.

La actividad bactericida de los sueros anti-CxBR y anti-CxB puede ser achacada a anticuerpos contra epitopos conformacionales de PorB, ya que estos dos sueros reconocieron los antígenos en Western-blotting tras ser separados por hrCNE. Este resultado coincide con los obtenidos por Wright JC y colaboradores²⁵⁰, quienes mostraron que la inmunización con PorB recombinante únicamente generaba anticuerpos bactericidas cuando era presentada con su conformación nativa por inclusión en liposomas o en micelas de detergentes, frente a la proteína recombinante sola, que no generaba anticuerpos bactericidas.

El suero anti-CxChap resultó bactericida contra la cepa homóloga, pudiendo ser responsables de dicha actividad los anticuerpos generados contra la chaperonina de 60 kDa o la MIP, ambas reconocidas por este suero en el Western-blotting a partir de gel SDS-PAGE. Estas proteínas fueron inmunogénicas y serían necesarias más pruebas para poder señalar a una de ellas o a ambas como inductora de anticuerpos bactericidas.

Los sueros anti-CxABR y anti-CxAB resultaron ambos bactericidas contra la cepa homóloga; sin embargo, el título alcanzado por el suero anti-CxABR fue mucho mayor que el conseguido por el suero anti-CxAB. La única diferencia entre los antígenos utilizados para obtener ambos sueros es la presencia de complejos PorA/PorB con RmpM, por lo que el mayor título de actividad bactericida podría ser debido a anticuerpos bactericidas contra epitopos presentes en los complejos PorA/PorB/RmpM, ausentes en el suero anti-CxAB.

²⁵⁰ **Wright JC, Williams JN, Christodoulides M, Heckels JE.** Immunization with the recombinant PorB outer membrane protein induces a bactericidal immune response against *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun.* 2002; 70: 4028-4034.

Cuando el ensayo se realizó con los sueros anti-complejos frente a las cepas heterólogas, únicamente el suero anti-CxAB fue bactericida contra al menos una de las cepas heterólogas, la cepa NmP27, sin encontrar una interpretación coherente que explicase la susceptibilidad de esta cepa al suero. La escasa reactividad cruzada de los sueros anti-complejos de porinas puso de manifiesto que los epitopos diana de los anticuerpos bactericidas no son conservados en las cepas testadas. Esta característica coincide con los resultados del ensayo de unión a superficie, en el que los sueros anti-complejo apenas mostraron unión de anticuerpos a la superficie bacteriana de las cepas heterólogas. En el caso concreto del suero anti-CxChap, sí se observó una buena unión de los anticuerpos contra todas las cepas, lo que indica un cierto grado de conservación de los epitopos reconocidos, aunque no conllevó a lisis celular mediada por complemento, aspecto que será discutido más adelante.

A pesar de la importancia de la actividad bactericida del suero para la lisis del meningococo, ciertos autores defienden que la fagocitosis mediada por opsoninas (anticuerpos y complemento) podría ser un importante mecanismo de protección contra la enfermedad meningocócica. Sin embargo, el posible papel protector es controvertido. El principal argumento contra el papel protector de la opsonofagocitosis es que individuos con deficiencias congénitas en componentes finales de la cascada del complemento (LCCD), a pesar de mantener intacta su función opsónica, presentan un riesgo de contraer la enfermedad 1000 veces mayor que individuos sin la deficiencia²⁵¹. Por el contrario, pacientes con función hipoesplénica y una actividad del complemento normal también ven aumentado el riesgo de enfermedad meningocócica. Algunos autores defienden la contribución independiente de la actividad fagocítica en la protección frente a la infección meningocócica²⁵². Los trabajos de Plested JS y colaboradores también apuntan a

²⁵¹ **Figueroa JE, Densen P.** Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin Microbiol Rev.* 1991; 4: 359-395.

²⁵² **Castagnola E, Fioredda F.** Prevention of life-threatening infections due to encapsulated bacteria in children with hyposplenism or asplenia: a brief review of current recommendations for practical purposes. *Eur J Haematol.* 2003; 71: 319-326.

papeles independientes de la actividad bactericida del suero y la actividad bactericida mediada por opsonofagocitosis en la protección contra el serogrupo B²²⁸.

En el estudio que aquí se presenta analizamos la inducción de fagocitosis por sueros anti-OMVs y anti-complejos purificados. La inducción de fagocitosis de todos los sueros anti-OMVs, incluso frente a las cepas heterólogas, puede ser debida a los diversos epitopos de los múltiples antígenos presentes en las OMVs empleadas en la inmunización. La ausencia de anticuerpos contra las proteínas PorA, PorB, RmpM o FetA en los respectivos sueros anti-OMVs mutantes no condicionó la fagocitosis, y las diferencias encontradas entre los sueros fueron dependientes de cepa, lo que podría achacarse a las características antigénicas o de accesibilidad de la membrana externa propias de cada cepa.

Cuando la inmunización se realizó con los complejos de porinas purificados, únicamente el suero anti-CxABR indujo la fagocitosis frente a la cepa homóloga aunque no contra las heterólogas, con la excepción de la cepa 3063. Nuevamente los complejos PorA/PorB/RmpM han generado una fuerte respuesta, en este caso opsonica, superior a la generada por los complejos de PorA/PorB, como ha ocurrido en el ensayo de actividad bactericida resaltando la importancia antigénica de estas estructuras.

El suero anti-CxChap, a pesar de no inducir fagocitosis de la cepa homóloga, sí lo hizo en las cepas heterólogas, siendo el que mayor reactividad cruzada mostró en este ensayo. Experimentos realizados en nuestro laboratorio empleando mutantes que expresan LOS con distintas longitudes demostraron como los LOS interfirieron en la accesibilidad de los anticuerpos por determinados antígenos subcapsulares²⁵³, lo que podría explicar que los anticuerpos presentes en el suero anti-CxChap

²⁵³ Arenas J, Abel A, Sánchez S, Marzoa J, Berrón S *et al.* A cross-reactive neisserial antigen encoded by the NMB0035 locus shows high sequence conservation but variable surface accessibility. *J Med Microbiol.* 2008; 57: 80-87.

responsables de la fagocitosis, la induzcan en las cepa heterólogas y no en la homóloga.

La realización de los experimentos de deposición de C3b y MAC ha permitido conocer mejor la secuencia de acontecimientos desde la unión de anticuerpos a la superficie bacteriana hasta la muerte celular por acción del complemento o por fagocitosis y, por tanto, definir mejor el tipo de respuesta generada por los distintos antígenos estudiados así como el grado de correlación entre la actividad bactericida y la actividad opsonofagocítica.

El suero anti-OMVs H44/76 y los sueros anti-OMVs mutantes mostraron, como hemos visto, una muy buena reactividad cruzada contra las cinco cepas heterólogas en los ensayos de unión de anticuerpos a superficie. Todos los sueros mostraron valores significativos y sin especial diferencias entre ellos, donde los valores alcanzados dependieron más de la cepa diana que del tipo de suero. Es en la deposición de C3b cuando se observa una separación en las vías de actuación activadas del sistema inmune. Estos sueros mantienen una excelente reactividad cruzada en el ensayo de opsonofagocitosis, alcanzando niveles de fluorescencia similares a los alcanzados por los sueros homólogos de cada cepa. Sin embargo, en los ensayos de deposición de C3b se observa un descenso de la reactividad cruzada, siendo en cualquier caso significativa, descenso que se acentúa en gran medida en la deposición del complejo de ataque a membrana (solo en el 40% de las cepas) y siendo únicamente un suero (anti-OMVs H44/76) el que mantiene actividad bactericida únicamente contra las cepas que comparten el epitopo P1.16, que no fueron necesariamente las que depositaron el MAC.

Estos resultados sugieren una cierta independencia en los mecanismos de activación de la actividad fagocítica y de la lisis mediada por complemento en la protección frente a la infección meningocócica, ya propuesta por otros

investigadores^{252,254}. Aunque el componente C3b es una importante opsonina, la reducción de deposición de C3b en las cepas heterólogas no afectó a la opsonofagocitosis y sí comprometió de manera importante la lisis mediada por complemento, resaltando de este modo la unión antígeno-anticuerpo como inductora de fagocitosis.

La respuesta contra los complejos proteicos, con la excepción del suero anti-CxChap que discutiremos más adelante, estuvo limitada por la escasa unión de los anticuerpos a la superficie bacteriana de las cepas heterólogas. Cuando los ensayos se realizaron contra la cepa homóloga, todos los sueros anti-complejos de porinas mostraron buena unión de anticuerpos a superficie, una deposición significativa de C3b y de MAC, aunque bastante menor que los alcanzados por los sueros anti-OMVs. Todos resultaron bactericidas, pero solamente uno (anti-CxABR) indujo opsonofagocitosis. Cuando estos ensayos se realizaron contra las cepas heterólogas, la escasa unión de anticuerpos-antígeno de los sueros anti-complejos de porinas no permitió una correcta activación del complemento, tal y como mostraron los ensayos realizados, limitando de este modo la deposición de C3b, la opsonofagocitosis, la deposición de MAC y la actividad bactericida del suero. Estos resultados sugieren que el tipo de respuesta inducida por los complejos de porinas es principalmente a través de anticuerpos que reconocen epitopos variables entre las cepas estudiadas, muy probablemente presentes en las porinas.

Sin embargo, el suero anti-CxChap ha aportado interesantes resultados debido a la excelente reactividad cruzada mostrada en los experimentos de unión de anticuerpos a superficie, deposición de C3b y MAC y opsonofagocitosis, invitando a indagar más en las características inmunogénicas de los dos antígenos detectados por Western-blotting con este suero. La buena reactividad cruzada dio lugar a la activación del complemento en los ensayos realizados con la mayoría de las cepas

²⁵⁴ **Plested JS, Granoff DM.** Vaccine-induced opsonophagocytic immunity to *Neisseria meningitidis* group B. *Clin Vaccine Immunol.* 2008; 15: 799-804.

heterólogas, lo que conllevó una excelente deposición de C3b y del MAC, así como una buena inducción de opsonofagocitosis. Estos resultados indican que los anticuerpos presentes en este suero inducen una respuesta opsonofagocítica y una respuesta humoral iniciadas por la unión antígeno-anticuerpo y potenciadas por la deposición de C3b. Lamentablemente, la buena deposición de MAC no se tradujo en lisis celular, posiblemente por una deposición no adecuada. La capacidad de los anticuerpos para mediar la actividad bactericida del suero depende principalmente de cinco factores: la clase y subclase de las inmunoglobulinas específicas del antígeno, la concentración de anticuerpos, la avidéz del anticuerpo por el antígeno, la densidad de epitopos diana en la superficie bacteriana y el correcto ensamblaje del complejo de ataque a membrana en la membrana externa²⁵⁵. La deposición de MAC en la superficie bacteriana como indican los resultados no implicó necesariamente muerte celular. Datos obtenidos de investigaciones en *Neisseria gonorrhoeae* sugieren que es la adecuada inserción del MAC y no la cantidad depositada en la superficie lo más importante para un lisis eficaz. Drogari-Apiranthitou M y colaboradores²⁵⁵ mostraron que la cantidad de deposición de MAC no se correlaciona directamente con la actividad bactericida del suero, al encontrar la deposición de MAC por sueros sin actividad bactericida. Los resultados de dicho trabajo concluyeron que es la adecuada inserción del MAC en la membrana la principal responsable de la lisis celular y no la cantidad del MAC depositado, explicando así los resultados del suero anti-CxChap y el suero anti-OMVs PorA-, no bactericida e inductor de la deposición de MAC en la cepa homóloga.

Los resultados obtenidos con el suero anti-CxChap hacen de los dos antígenos detectados con este suero (la chaperonina de 60 kDa y la MIP) dos candidatos con buen potencial vacunal. La proteína chaperonina de 60 kDa muestra una secuencia aminoacídica altamente conservada y la presencia de anticuerpos

²⁵⁵ **Drogari-Apiranthitou M, Kuijper EJ, Dekker N, Dankert J.** Complement activation and formation of the membrane attack complex on serogroup B *Neisseria meningitidis* in the presence or absence of serum bactericidal activity. *Infect Immun.* 2002; 70: 3752-3728.

contra ella ya ha sido documentada en sueros de pacientes convalecientes y en fase aguda de meningitis²⁵⁶, así como de *N. gonorrhoeae*. Su homólogo en *Streptococcus pneumoniae*, la proteína Gróela (Msp60), ha sido descrita recientemente como un antígeno inmunogénico y con eficacia protectora frente a la infección letal en ratones²⁵⁷. La proteína MIP de *N. meningitidis* apenas está descrita en la literatura; sin embargo, su alta inmunogenicidad delatada en el análisis por Western-blotting y su importancia durante los procesos de infección de otros microorganismos patógenos^{258,259}, hacen de ella una proteína de gran interés. Lamentablemente, la ausencia de actividad bactericida contra las cepas heterólogas utilizando complemento de conejo a dilución 1/8 resulta poco alentadora, considerando que actualmente éste es el indicador aceptado como correlación de protección.

Sin embargo, esto no debe ser considerado como una característica excluyente a la hora de considerar su potencial vacunal. Diversos autores defienden que un título de actividad bactericida del suero que no alcance el ≥ 4 no implica necesariamente mayor susceptibilidad a la enfermedad frente al serogrupo B, sugiriendo la importancia de otros mecanismos de protección frente a la enfermedad meningocócica. Recientes evidencias sugieren que este título umbral de actividad bactericida podría ser suficiente pero no indispensable para una buena protección: el rápido descenso de la incidencia de la enfermedad entre los 1 y 4 años de edad no se corresponde con un aumento de los títulos a ≥ 4 ²²⁰. Por otro lado, en un estudio reciente en el Reino Unido se observa que el pico de incidencia de la enfermedad en la adolescencia coincide paradójicamente con un incremento de la proporción de

²⁵⁶ Pannekoek Y, Dankert J, van Putten JP. Identification and characterization of a cross-reactive and a unique B-cell epitope on the hsp60 homologue from *Neisseria gonorrhoeae*. *FEMS Microbiol Lett.* 1992; 78: 23-29.

²⁵⁷ Khan MN, Shukla D, Bansal A, Mustoori S, Ilavazhagan G. Immunogenicity and protective efficacy of GroEL (hsp60) of *Streptococcus pneumoniae* against lethal infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009; 56: 56-62.

²⁵⁸ Lundemose AG, Rouch DA, Penn CW, Pearce JH. The *Chlamydia trachomatis* Mip-like protein is a lipoprotein. *J Bacteriol.* 1993; 175: 3669-3671.

²⁵⁹ Wintermeyer E, Ludwig B, Steinert M, Schmidt B, Fischer G *et al.* Influence of site specifically altered Mip proteins on intracellular survival of *Legionella pneumophila* in eukaryotic cells. *Infect Immun.* 1995; 63: 4576-4583.

individuos con títulos de actividad bactericida ≤ 4 , y adultos con una baja prevalencia de actividad bactericida tuvieron un riesgo bajo de padecer la enfermedad²⁶⁰. En un estudio en Islandia, los títulos de actividad bactericida han subestimado la eficacia vacunal²⁶¹. Por otro lado, los estudios de eficacia de la vacuna neozelandesa MenNZvac encuentran una explicación más acertada a su efectividad en menores de 5 años (80%) cuando la basan un incremento de los títulos de actividad bactericida de suero ≥ 4 y opsonofagocitosis y no únicamente en lo primero²⁶².

La escasa reactividad cruzada de los sueros anti-complejos de porinas en el ensayo de actividad bactericida, no corroboró la hipótesis planteada en este trabajo de la posible existencia de epitopos protectivos conservados en los complejos proteicos de porinas, teniendo en consideración que el ensayo de actividad bactericida es el indicador de protección aceptado. Tanto la deposición de C3b y de MAC por estos sueros contra cepas heterólogas se vio drásticamente afectado por las distintas características antigénicas de cada cepa. Sin embargo, las diferencias observadas entre los sueros anti-CxABR y anti-CxAB sugieren la existencia de epitopos que sólo se mantienen en los complejos formados cuando está presente la RmpM, y que determinan la inducción de opsonofagocitosis y la deposición de MAC incluso en la cepa homóloga. Este resultado respalda la posibilidad de epitopos conformacionales protectivos y anima a continuar su búsqueda en otro tipo de complejos proteicos.

²⁶⁰ Trotter C, Findlow J, Balmer P, Holland A, Barchha R *et al.* Seroprevalence of bactericidal and anti-outer membrane vesicle antibodies to *Neisseria meningitidis* group B in England. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14: 863-868.

²⁶¹ Perkins BA, Jonsdottir K, Briem H, Griffiths E, Plikaytis BD, Hoiby EA, Rosenqvist E, Holst J, Nokleby H, Sotolongo F, Sierra G, Campa HC, Carlone GM, Williams D, Dykes J, Kapczynski D, Tikhomirov E, Wenger JD, Broome CV. Immunogenicity of two efficacious outer membrane protein-based serogroup B meningococcal vaccines among young adults in Iceland. *J Infect Dis.* 1998; 177: 683-691.

²⁶² Aase A. Opsonic assay for meningococcal serogroups A and B. *Vaccinmonitor* 2009; 18: 27.

CONCLUSIONES

- I. La electroforesis hrCNE y las electroforesis bidimensionales hrCNE/hrCNE y hrCNE/SDS-PAGE mostraron un gran potencial en la separación y caracterización de complejos proteicos de membrana, obteniendo en todas ellas una resolución superior a otras electroforesis nativas probadas como BNE y CNE, lo que las convierte en técnicas muy apropiadas para el estudio del complexoma de membrana externa de *N. meningitidis*.
- II. Hemos demostrado la presencia de 12 complejos proteicos mayoritarios en la membrana externa de *N. meningitidis*. Tres complejos son asociaciones homoméricas de la chaperonina de 60 kDa, la glutamina sintetasa y la cetol-ácido reductoisomerasa, y nueve son complejos de porinas, correspondientes a homómeros de PorB y tres tipos de asociaciones heteroméricas de porinas: PorA/PorB, PorB/RmpM y PorA/PorB/RmpM. En menor proporción también se detectaron homómeros de PorA y complejos de alto peso molecular formados por PorA/PorB/RmpM/MIP.
- III. La existencia de esta gran diversidad de complejos proteicos de porinas sugiere, bien la presencia simultánea de complejos con igual composición proteica pero con diferente estequiometría, o bien la participación de otras proteínas en dichos complejos.
- IV. Las importantes alteraciones sufridas en el complexoma de membrana externa debido a la ausencia de la PorB en la correspondiente cepa mutante, confirman el papel esencial de esta proteína en el mantenimiento de la integridad de los complejos de porinas.
- V. La eliminación de la PorA (inmunodominante y variable) en las OMVs, así como de las proteínas PorB, RmpM o FetA, permite mantener una excelente unión de anticuerpos a superficie, deposición de complemento y actividad opsonofagocítica incluso contra las cepas heterólogas. Solamente la ausencia

de anticuerpos contra la PorA produce la pérdida de la actividad bactericida del suero anti-OMVs.

- VI. Todos los complejos purificados son accesibles en superficie e inducen respuestas que promueven la deposición del componente del complemento C3b, la formación del complejo de ataque a membrana y la actividad bactericida. La escasa reactividad cruzada de los sueros anti-complejos de porinas reduce su interés vacunal a la protección frente a la cepa homóloga.
- VII. La alta reactividad cruzada del suero anti-CxChap en los ensayos de unión de anticuerpos a superficie, deposición de C3b, deposición de MAC y actividad opsonofagocítica sugiere que las proteínas chaperonina de 60 kDa y MIP pueden ser antígenos con gran interés como componentes vacunales.

BIBLIOGRAFÍA

- Aase A.** *Vaccimonitor* 2009; 18: 27.
- Aase A, Michaelsen TE.** *Scand J Immunol.* 1994; 39: 581-587.
- Achtman M, van der Ende A, Zhu P, Koroleva IS, Kusecek B, Morelli G, Schuurman IG, Brieske N, Zurth K, Kostyukova NN, Platonov AE.** *Emerg Infect Dis.* 2001; 7: 420-427.
- Ala'Aldeen DA, Neal KR, Ait-Tahar K, Nguyen-Van-Tam JS, English A, Falla TJ, Hawkey PM, Slack RC.** *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 2311-2316.
- Alcalá B, Arreaza L, Salcedo C, Uría MJ, De La Fuente L, Vázquez JA.** *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 1512-1514.
- Arakere G, Kessel M, Nguyen N, Frasc CE.** *J Bacteriol.* 1993; 175: 3664-3668.
- Arakere G, Kessel M, Nguyen N, Frasc CE.** *J Bacteriol.* 1993; 175: 3664-3668.
- Arcondéguy T, Jack R, Merrick M.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001; 65:80-105.
- Arenas J, Abel A, Sánchez S, Alcalá B, Criado MT, Ferreirós CM.** *Int Microbiol.* 2006; 9: 273-280.
- Arenas J, Abel A, Sánchez S, Marzoa J, Berrón S, van der Ley P, Criado MT, Ferreirós CM.** *J Med Microbiol.* 2008; 57: 80-87.
- Arnold DF, Roberts AG, Thomas A, Ferry B, Morgan BP, Chapel H.** *J Clin Immunol.* 2009; 29: 691-695.
- Arnon R, Van Regenmortel MH.** *FASEB J.* 1992; 6: 3265-3274.
- Baker MG, Martin DR, Kieft CE, Lennon D.** *J Paediatr Child Health.* 2001; 37: 13-19.
- Bambini S, Rappuoli R.** *Drug Discovery Today.* 2009; 14: 252-60.
- Beddek AJ, Li MS, Kroll JS, Jordan TW, Martin DR.** *Infect Immun.* 2009; 77: 2989-2994.
- Bentley SD, Vernikos GS, Snyder LA, Churcher C, Arrowsmith C, Chillingworth T, Cronin A, Davis PH, Holroyd NE, Jagels K, Maddison M, Moule S, Rabinowitsch E, Sharp S, Unwin L, Whitehead S, Quail MA, Achtman M, Barrell B, Saunders NJ, Parkhill J.** *PLoS Genet.* 2007;3: 23.
- Berggård T, Linse S, James P.** *Proteomics.* 2007; 7: 2833-2842.
- Biesma DH, Hannema AJ, van Velzen-Blad H, Mulder L, van Zwieten R, Kluijt I, Roos D.** *J Clin Invest.* 2001; 108: 233-240.
- Billker O, Gödert S, Meyer TF.** En: Ferreirós CM, Criado MT, Vázquez J. (Eds.) *Emerging Strategies In The Fight Against Meningitis: Molecular and Cellular Aspects.* 2002; Reino Unido: Horizon Scientific Press.
- Bjune G, Høiby EA, Grønnesby JK, Arnesen O, Fredriksen JH, Halstensen A, Holten E, Lindbak AK, Nøkleby H, Rosenqvist E.** *Lancet.* 1991; 338: 1093-1096.

- Blom AM.** *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2004; 64: 479-496.
- Boisier P, Nicolas P, Djibo S, Taha MK, Jeanne I, Maïnassara HB, Tenebray B, Kairo KK, Giorgini D, Chanteau S.** *Clin Infect Dis.* 2007; 44: 657-663.
- Borrow R, Balmer P, Miller E.** *Vaccine.* 2005; 23: 2222-2227.
- Borrow R, Fox AJ, Cartwright K, Begg NT, Jones DM.** *Epidemiol Infect.* 1999; 123: 201-208.
- Bos MP, Tommassen J.** *Curr Opin Microbiol.* 2004; 7 :610-616.
- Boslego J, Garcia J, Cruz C, Zollinger W, Brandt B, Ruiz S, Martinez M, Arthur J, Underwood P, Silva W, Moran E, Hankins W, Gilly J, Mays J, Chilean National Committee for Meningococcal Disease.** *Vaccine.* 1995; 13: 821-829.
- Botto M, Fong KY, So AK, Barlow R, Routier R, Morley BJ, Walport MJ.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89: 4957-4961.
- Boutriau D, Poolman J, Borrow R, Findlow J, Domingo JD, Puig-Barbera J, Baldó JM, Planelles V, Jubert A, Colomer J, Gil A, Levie K, Kervyn AD, Weynants V, Dominguez F, Barberá R, Sotolongo F.** *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14: 65-73.
- Bredemeier R, Schlegel T, Ertel F, Vojta A, Borissenko L, Bohnsack MT, Groll M, von Haeseler A, Schleiff E.** *J Biol Chem.* 2007; 282: 1882-1890.
- Bredius RG, Derkx BH, Fijen CA, de Wit TP, de Haas M, Weening RS, van de Winkel JG, Out TA.** *J Infect Dis.* 1994; 170: 848-853.
- Brodeur BR, Larose Y, Tsang P, Hamel J, Ashton F, Ryan A.** *Infect Immun.* 1985; 50: 510-516.
- Bruge J, Bouveret-Le Cam N, Danve B, Rougon G, Schulz D.** *Vaccine.* 2004; 22: 1087-96.
- Buchanan SK.** *Curr Opin Struct Biol.* 1999; 9: 455-461.
- Burgess RR.** *Methods Enzymol.* 2009; 463: 565-572.
- Byrne B, Iwata S.** *Curr Opin Struct Biol.* 2002; 12: 239-243.
- Carbonnelle E, Hill DJ, Morand P, Griffiths NJ, Bourdoulous S, Murillo I, Nassif X, Virji M.** *Vaccine.* 2009 ; 27: 78-89.
- Castagnola E, Fioredda F.** *Eur J Haematol.* 2003; 71: 319-326.
- Caugant DA, Frøholm LO, Bøvre K, Holten E, Frasch CE, Mocca LF, Zollinger WD, Selander RK.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83: 4927-4931.
- Caugant DA, Kristiansen BE, Frøholm LO, Bøvre K, Selander RK.** *Infect Immun.* 1988; 56: 2060-2068.

- Caugant DA.** *Infect Genet Evol.* 2008; 8: 558-565.
- Cervera J, Komarov AG, Aguilera VM.** *Biophys J.* 2008; 94: 1194-1202.
- Ciruela F.** *Curr Opin Biotechnol.* 2008; 19: 338-343.
- Claassen I, Meylis J, van der Ley P, Peeters C, Brons H, Robert J, Borsboom D, van der Ark A, van Straaten I, Roholl P, Kuipers B, Poolman J.** *Vaccine.* 1996; 14: 1001-1008.
- Cooper MA.** *Anal. Bioanal. Chem.* 2003; 377: 834-842.
- Corbett A, Exley R, Bourdoulous S, Tang CM.** *Expert Rev Mol Med.* 2004; 6: 1-14.
- Counts GW, Gregory DF, Spearman JG, Lee BA, Filice GA, Holmes KK, Griffiss JM.** *Rev Infect Dis.* 1984; 6: 640-648.
- Coutinho A, Möller G.** *Eur J Immunol.* 1973; 3: 608-613.
- Cowan SW, Schirmer T, Rummel G, Steiert M, Ghosh R, Paupit RA, Jansonius JN, Rosenbusch JP.** *Nature.* 1992; 358: 727-733.
- de Kleijn ED, de Groot R, Labadie J, Lafeber AB, van den Dobbelsteen G, van Alphen L, van Dijken H, Kuipers B, van Omme GW, Wala M, Juttman R, Rümke HC.** *Vaccine.* 2000; 18: 1456-1466.
- Deng M, Mehta S, Sun F, Chen T.** *Genome Res.* 2002; 12: 1540-1548.
- Densen P, Weiler JM, Griffiss JM, Hoffmann LG.** *N Engl J Med.* 1987; 316: 922-926.
- Derrick JP, Urwin R, Suker J, Feavers IM, Maiden MC.** *Infect Immun.* 1999; 67: 2406-2413.
- Doerrler WT, Raetz CR.** *J Biol Chem.* 2005; 280: 27679-27687
- Doulet N, Donnadiou E, Laran-Chich MP, Niedergang F, Nassif X, Couraud PO, Bourdoulous S.** *J Cell Biol.* 2006. 173: 627-637.
- Drogari-Apiranthitou M, Kuijper EJ, Dekker N, Dankert J.** *Infect Immun.* 2002; 70: 3752-3728.
- Estabrook MM, Christopher NC, Griffiss JM, Baker CJ, Mandrell RE.** *J Infect Dis.* 1992; 166: 1079-1088.
- Estabrook MM, Griffiss JM, Jarvis GA.** *Infect Immun.* 1997; 65: 436-444.
- Exley RM, Sim R, Goodwin L, Winterbotham M, Schneider MC, Read RC, Tang CM.** *Infect Immun.* 2009; 77: 45-51.
- Feavers I.** *Expert Rev Vaccines.* 2009; 8: 1461-1463.
- Feavers IM, Maiden MC.** *Mol Microbiol.* 1998; 30: 647-656.

- Feavers IM, Pizza M. *Vaccine*. 2009; 27: 42-50.
- Fernández-Patrón C. The protein Protocols Handbook, 2nd Edition. Ed: JM Walker© Human Press Inc., Totowa, NJ.
- Ferrari G, Garaguso I, Adu-Bobie J, Doro F, Taddei AR, Biolchi A, Brunelli B, Giuliani MM, Pizza M, Norais N, Grandi G. *Proteomics*. 2006; 6: 1856-1866.
- Ferrari G, Garaguso I, Adu-Bobie J, Doro F, Taddei AR, Biolchi A, Brunelli B, Giuliani MM, Pizza M, Norais N, Grandi G. *Proteomics* 2006; 6: 1856-1866.
- Figuerola JE, Densen P. *Clin Microbiol Rev*. 1991; 4: 359-395.
- Fijen CA, Kuijper EJ, Bulte MT, Daha MR, Dankert J. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 98-105.
- Findlow J, Taylor S, Aase A, Horton R, Heyderman R, Southern J, Andrews N, Barchha R, Harrison E, Lowe A, Boxer E, Heaton C, Balmer P, Kaczmarek E, Oster P, Gorringe A, Borrow R, Miller E. *Infect Immun*. 2006; 74: 4557-4565.
- Finne J, Leinonen M, Makela PH. *Lancet*. 1982; 2: 355-357.
- Finney M, Vaughan T, Taylor S, Hudson MJ, Pratt C, Wheeler JX, Vipond C, Feavers I, Jones C, Findlow J, Borrow R, Gorringe A. *Hum Vaccine*. 2008; 4: 23-30.
- Fouriel D, Bernadac A, Pagès JM. *Eur J Biochem*. 1994; 222: 625-30.
- Frasch CE, Borrow R, Donnelly J. *Vaccine*. 2009; 27: 112-116.
- Frasch CE, Zollinger WD, Poolman JT. *Rev Infect Dis*. 1985; 7: 504-510.
- Fredriksen JH, Rosenqvist E, Wedege E, Bryn K, Bjune G, Frøholm LO, Lindbak AK, Møgster B, Namork E, Rye U. *NIPH Ann*. 1991; 14: 67-80.
- Fusci PC, Michon F, Tai JY, Blake MS. *J Infect Dis*. 1997; 175: 364-372.
- Genevrois S, Steeghs L, Roholl P, Letesson JJ, van der Ley P. *EMBO J*. 2003; 22: 1780-1789.
- Geoffroy MC, Floquet S, Metais A, Nassif X, Pelicic V. *Genome Res* 2003; 13: 391-398.
- Georgousakis MM, Hofmann A, Batzloff MR, McMillan DJ, Sriprakash KS. *Vaccine*. 2009; 27: 6799-6806.
- Gil J, Betancourt LZ, Sardiñas G, Yero D, Niebla O, Delgado M, García D, Pajón R, Sánchez A, González LJ, Padrón G, Campa C, Sotolongo F, Barberó R, Guillén G, Herrera L, Besada V. *Hum Vaccin*. 2009; 5: 347-356.
- Giuliani MM, Adu-Bobie J, Comanducci M, Aricò B, Savino S, Santini L, Brunelli B, Bambini S, Biolchi A, Capecci B, Cartocci E, Ciocchi L, Di Marcello F, Ferlicca F, Galli B, Luzzi E, Massignani V, Serruto D, Veggi D, Contorni M, Morandi M, Bartalesi A, Cinotti V, Mannucci D, Titta F, Ovidi E, Welsch JA,

- Granoff D, Rappuoli R, Pizza M.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 10834-10839.
- Goldblatt D.** *Dev Biol Stand.* 1998; 95: 125-132.
- Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS.** *J Exp Med.* 1969; 129: 1307-1326.
- Gómez JA, Criado MT, Ferreirós CM.** *FEMS Immunol. Med. Microb.* 1997; 20: 79-86.
- Gómez JA, Criado MT, Ferreirós CM.** *Res Microbiol.* 1998; 149: 381-387.
- Gorringe A, Halliwell D, Matheson M, Reddin K, Finney M, Hudson M.** *Vaccine.* 2005; 23: 2210-2213.
- Gorringe AR, Oakhill J.** En: Ferreirós C., Criado M.T., Vázquez J. (Eds). *Emerging Strategies In The Fight Against Meningitis: Molecular And Cellular Aspects.* 2002. Reino Unido: Horizon Scientific Press, Wymondham.
- Gorringe AR, Taylor S, Brookes C, Matheson M, Finney M, Kerr M, Hudson M, Findlow J, Borrow R, Andrews N, Kafatos G, Evans CM, Read RC.** *Clin Vaccine Immunol.* 2009; 16: 1113-1120.
- Gorringe AR.** *Expert Rev Vaccines.* 2005; 4: 373-379.
- Gotschlich EC, Goldschneider I, Artenstein MS.** *J Exp Med.* 1969; 129: 1367-1384.
- Gotschlich EC, Liu TY, Artenstein MS.** *J Exp Med.* 1969; 129: 1349-1365.
- Granoff DM.** *Vaccine.* 2009; 27: 117-125.
- Granoff DM, Harrison LH, Borrow R. Granoff DM, Harrison LH, Borrow R.** En: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA (Eds). *Vaccines.* 2004. Reino Unido: Elsevier Inc; 2008. p. 399-432.
- Granoff DM, Pollard AJ.** *Pediatr Infect Dis J.* 2007; 26: 716-722.
- Granoff DM, Welsch JA, Ram S.** *Infect Immun.* 2009; 77: 764-769.
- Gray-Owen SD, Schryvers AB.** *Trends Microbiol.* 1996; 4: 185-191.
- Grizot S, Buchanan SK.** *Mol Microbiol.* 2004; 51: 1027-1037.
- Gupta K, Gupta RK, Hajela K.** *Indian J Med Res.* 2008; 127: 431-440.
- Halperin SA, Langley JM, Smith B, Wunderli P, Kaufman L, Kimura A, Martin D.** *Vaccine.* 2007; 25: 450-457.
- Halstensen A, Haneberg B.** *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C.* 1987; 95: 155-160.
- Hammerschmidt S, Müller A, Sillmann H, Mühlenhoff M, Borrow R, Fox A, van Putten J, Zollinger WD, Gerardy-Schahn R, Frosch M.** *Mol Microbiol.* 1996; 20: 1211-1220.
- Haralambous E, Dolly SO, Hibberd ML, Litt DJ, Udalova IA, O'dwyer C, Langford PR, Simon Kroll J, Levin**

- M. *Scand J Infect Dis.* 2006; 38: 764-771.
- Harrison LH. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19: 142-164.
- Hempelmann E, Schulze M, Götze O. En: Neuhof V (Eds). *Electrophoresis '84.* 1984. Verlag Chemie Weinheim. p. 328-330
- Hill HS, Pfluegl GM, Eisenberg D. *Biochemistry* 2002; 41: 9863-9872.
- Hodgson A, Forgor AA, Chandramohan D, Reed Z, Binka F, Bevilacqua C, Boutriau D, Greenwood B. *PLoS One.* 2008; 3: (e)2159.
- Holst J, Feiring B, Fuglesang JE, Høiby EA, Nøkleby H, Aaberge IS, Rosenqvist E. *Vaccine.* 2003; 21: 734-737.
- Hooker BS, Bigelow DJ, Lin CT. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 363: 457-461.
- Ison CA, Anwar N, Cole MJ, Galassini R, Heyderman RS, Klein NJ, West J, Pollard AJ, Morley S, Levin and the Meningococcal R. *Microb Pathog.* 1999; 27: 207-214.
- Ito HO, Nakashima T, So T, Hirata M, Inoue M. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 308: 770-776.
- Jackson LA, Baxter R, Reisinger K, Karsten A, Shah J, Bedell L, Dull PM. *Clin Infect Dis.* 2009; 49: 1-10.
- Jansen C, Wiese A, Reubsæet L, Dekker N, de Cock H, Seydel U, Tommassen J. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1464: 284-298.
- Jarva H, Ram S, Vogel U, Blom AM, Meri S. *J Immunol.* 2005;174: 6299-6307.
- Jarvis GA, Vedros NA. *Infect Immun.* 1987; 55: 174-180.
- Jeanteur D, Lakey JH, Pattus F. *Mol. Microbiol.* 1991; 5: 2153-2164.
- Jennings HJ, Roy R, Gamian A. *J. Immunol.* 1986; 137: 1708-1713.
- Jessouroun E, da Silveira IF, Larangeira AP, Pereira S, Fernandes SA, Rabinovitch L, Frascch CE, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. *Vaccine.* 2004; 22: 2617-2625.
- Jolley KA, Brehony C, Maiden MC. *FEMS Microbiol Rev.* 2007; 31: 89-96.
- Källström H, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB. *Mol Microbiol.* 1997; 25: 639-647.
- Kashino Y. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003; 797: 191-216.
- Keiser PB, Moran EE, Schmiel DH, Pinto CB, Coster TS, Gibbs BT, Zollinger WD. *16th International Pathogenic Neisseria Conference* 2008, p: 273.
- Kelly C, Arnold R, Galloway Y, O'Hallahan J. *Am J Epidemiol.* 2007; 166: 817-823.

- Kelly DF, Pollard AJ, Moxon ER. *JAMA*. 2005; 294: 3019-3023.
- Kelly DF, Snape MD, Clutterbuck EA, Green S, Snowden C, Diggle L, Yu LM, Borkowski A, Moxon ER, Pollard AJ. *Blood*. 2006; 108: 2642-2647.
- Khan MN, Shukla D, Bansal A, Mustoori S, Ilavazhagan G. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009; 56: 56-62.
- Khun HH, Kirby SD, Lee BC. *Infect. Immun*. 1998; 66: 2330-2336.
- Koeberling O, Giuntini S, Seubert A, Granoff DM. *Clin Vaccine Immunol*. 2009; 16: 156-162.
- Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P. *Mol. Microbiol*. 2000; 37: 239-253.
- Krause F. *Electrophoresis*. 2006; 27: 2759-2781.
- Kreusch A, Schulz GE. *J Mol Biol*. 1994; 243: 891-905.
- Laemmli UK. *Nature* 1970; 227: 680.
- Lalonde S, Ehrhardt DW, Loqué D, Chen J, Rhee SY, Frommer WB. *Plant J*. 2008; 53: 610-635.
- Leach A, Twumasi PA, Kumah S, Banya WS, Jaffar S, Forrest BD, Granoff DM, LiButti DE, Carlone GM, Pais LB, Broome CV, Greenwood BM. *J Infect Dis*. 1997; 175: 200-204.
- Lee EY, Choi DS, Kim KP, Gho YS. *Mass Spectrom Rev*. 2008; 27: 535-555.
- Legrain M, Mazarin V, Irwin SW, Bouchon B, Quentin-Millet MJ, Jacobs E, Schryvers AB. *Gene*. 1993; 130: 73-80.
- Leuzzi R, Serino L, Scarselli M, Savino S, Fontana MR, Monaci E, Taddei A, Fischer G, Rappuoli R, Pizza M. *Mol Microbiol*. 2005; 58: 669-681.
- Lewis LA, Gray E, Wang YP, Roe BA, Dyer DW. 1997; 23: 737-749.
- Lowell GH, Smith LF, Griffiss JM, Brandt BL, MacDermott RP. *J Clin Invest*. 1980; 66: 260-267.
- Luijkx TA, van Dijken H, Hamstra HJ, Kuipers B, van der Ley P, van Alphen L, van den Dobbelsteen G. *Infect Immun*. 2003; 71: 6367-6371.
- Lundemose AG, Kay JE, Pearce JH. *Mol Microbiol*. 1993; 7: 777-783.
- Lundemose AG, Rouch DA, Penn CW, Pearce JH. *J Bacteriol*. 1993; 175: 3669-3671.
- MacDonald NE, Halperin SA, Law BJ, Forrest B, Danzig LE, Granoff DM. *JAMA*. 1998; 280: 1685-1689.
- MacLennan J, Obaro S, Deeks J, Lake D, Elie C, Carlone G, Moxon ER, Greenwood B. *J Infect Dis*. 2001; 183: 97-104.

- Malorny B, Morelli G, Kusecek B, Kolberg J, Achtman M. *J Bacteriol.* 1998; 180: 1323-1330.
- Marc LaForce F, Ravenscroft N, Djingarey M, Viviani S. *Vaccine.* 2009; 27: 13-19.
- Marshall H, Nissen MD, Richmond P, Lambert S, Robertson DM, Jones T, Lockhart S, Gruber W, Arora A. *16th International Pathogenic Neisseria Conference* 2008, p. 271.
- Martínez JE, Romero-Steiner S, Pilishvili T, Barnard S, Schinsky J, Goldblatt D, Carlone GM. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6: 581-586.
- Martins MS, Périssé ARS, Camacho LAB, Santos TM, Silveira IAFB, Leal ML, Marcovistz R, Maia MLS, Homma A, Jessouroun E. *Vaccinmonitor*, 2009; 18: 41.
- Marzoa J, Abel A, Sánchez S, Chan H, Feavers I, Criado MT, Ferreirós CM. *Proteomics.* 2009; 9: 648-656.
- Massari P, King CA, MacLeod H, Wetzler LM. *Protein Expr Purif.* 2005; 44: 136-146.
- Massari P, Ram S, Macleod H, Wetzler LM. *Trends Microbiol.* 2003; 11: 87-93.
- McGuinness BT, Lambden PR, Heckels JE. *Mol Microbiol.* 1993; 7: 505-514.
- Menezes M, Périssé ARS, Camacho LAB, Santos TM, Silveira IAFB, Maia MLS, Homma A, Jessouroun E. *Vaccinmonitor*. 2009; 18: 40.
- Merker P, Tommassen J, Kusecek B, Virji M, Sesardic D, Achtman M. *Mol Microbiol.* 1997; 23: 281-293.
- Michaelsen TE, Kolberg J, Aase A, Herstad TK, Høiby EA. *Scand J Immunol.* 2004; 59: 34-39.
- Miernyk JA, Thelen JJ. *Plant J.* 2008; 53: 597-609.
- Miller JP, Lo RS, Ben-Hur A, Desmarais C, Stagljar I, Noble WS, Fields S. 2005. *Proc Nat Acad Sci USA*; 102: 12123-12128.
- Minetti CA, Blake MS, Remeta DP. *J Biol Chem.* 1998; 273: 25329-25338.
- Minetti CA, Tai JY, Blake MS, Pullen JK, Liang SM, Remeta DP. *J Biol Chem.* 1997; 272: 10710-10720.
- Morley SL, Cole MJ, Ison CA, Camaraza MA, Sotolongo F, Anwar N, Cuevas I, Carbonero M, Campa HC, Sierra G, Levin M. *Pediatr Infect Dis J.* 2001; 20: 1054-1061.
- Muller E, Apicella MA. *Infect Immun.* 1988; 56: 259-266.
- Neff D, Dencher NA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 259: 569-575.
- Neuhoff V, Stam R, Eibl H. *Electrophoresis.* 1985; 6: 427-448.
- Newhall WJ, Wilde CE, Sawyer WD, Haak RA. *Infect. Immun.* 1980; 27: 475-482.

- Nooren IM, Thornton JM. *EMBO J.* 2003; 22: 3486-3492.
- Norheim G, Aase A, Caugant DA, Høiby EA, Fritzsønn E, Tangen T, Kristiansen P, Heggelund U, Rosenqvist E. *Vaccine.* 2005; 23: 3762-3774.
- Novotny LA, Bakaletz LO. *J Immunol.* 2003; 171: 1978-1983.
- Olyhoek T, Crowe BA, Achtman M. *Rev Infect Dis.* 1987; 9: 665-692.
- Oster P, Borrow R, Findlow J, Holland A, Telford K, Snape M, Miller E, Pollard AJ. *Vaccinmonitor.* 2009; 18: 22.
- Oster P, Lennon D, O'Hallahan J, Mulholland K, Reid S, Martin D. *Vaccine.* 2005; 23: 2191-2196.
- Ostergaard L, Lebacqz E, Poolman J, Maechler G, Boutriau D.. *Vaccine.* 2009; 27: 161-168.
- Pannekoek Y, Dankert J, van Putten JP. *Mol Microbiol.* 1995; 15: 277-285.
- Pannekoek Y, Dankert J, van Putten JP. *FEMS Microbiol Lett.* 1992; 78: 23-29.
- Pannekoek Y, Schuurman IG, Dankert J, van Putten JP. *Clin Exp Immunol.* 1993; 93: 377-381.
- Pannekoek Y, van Putten JPM, Dankert J. *J Bacteriol.* 1992; 174: 6928-6937.
- Parkhill J, Achtman M, James KD, Bentley SD, Churcher C, Klee SR, Morelli G, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Davies RM, Davis P, Devlin K, Feltwell T, Hamlin N, Holroyd S, Jagels K, Leather S, Moule S, Mungall K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Simmonds M, Skelton J, Whitehead S, Spratt BG, Barrell BG. *Nature.* 2000; 404: 502-506.
- Pavliak V, Brisson JR, Michon F, Uhrin D, Jennings HJ. *J Biol Chem.* 1993; 268: 14146-14152.
- Peleg D, Harit-Bustan H, Katz Y, Peller S, Schlesinger M, Schonfeld S. *Pediatr Infect Dis J.* 1992; 11: 401-404.
- Peltola H, Mäkelä PH, ELO O, Pettay O, Renkonen OV, Sivonen A. *Scand J Infect Dis.* 1976; 8: 169-174.
- Perkins BA, Jonsdottir K, Briem H, Griffiths E, Plikaytis BD, Hoiby EA, Rosenqvist E, Holst J, Nokleby H, Sotolongo F, Sierra G, Campa HC, Carlone GM, Williams D, Dykes J, Kapczynski D, Tikhomirov E, Wenger JD, Broome CV. *J Infect Dis.* 1998; 177: 683-691.
- Perkins-Balding D, Ratliff-Griffin M, Stojiljkovic I. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68: 154-171.
- Peters MJ, Heyderman RS, Faust S, Dixon GL, Inwald DP, Klein NJ. *J Leukoc Biol.* 2003; 7: 722-730.
- Pettersson A, Klarenbeek V, van Deurzen J, Poolman JT, Tommassen J. *Mol Microbiol.* 1998. 27: 599-610.
- Pettersson A, Klarenbeek V, van Deurzen J, Poolman JT, Tommassen J. *Microb Pathog.* 1994; 17: 395-408.

- Phizicky EM, Fields S. *Microbiol Rev.* 1995; 59: 94-123.
- Pizza M, Donnelly J, Rappuoli R. 2008; 26: 146-148.
- Platonov AE, Vershinina IV, Käyhty H, Fijen CA, Würzner R, Kuijper EJ. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003; 130: 314-321.
- Plested JS, Granoff DM. *Clin Vaccine Immunol.* 2008; 15: 799-804.
- Pollard AJ, Frasch C. *Vaccine.* 2001; 19: 1327-1346.
- Pollard AJ, Perrett KP, Beverley PC. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9: 213-220.
- Prinz T, Tommassen J. *FEMS Microbiol Lett.* 2000; 183: 49-53.
- Qu J, Mayer C, Behrens S, Holst O, Kleinschmidt JH. *J Mol Biol.* 2007; 374: 91-105.
- Rameix-Welti MA, Régnier CH, Bienaimé F, Blouin J, Schifferli J, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Frémeaux-Bacchi V. *Eur J Immunol.* 2007; 37: 1377-1385.
- Rappuoli R. 16th International Pathogenic Neisseria Conference 2008, p:86.
- Reinisch N, Kiechl S, Mayr C, Schratzberger P, Dunzendorfer S, Kähler CM, Buratti T, Willeit J, Wiedermann CJ. *Eur J Clin Invest.* 1998; 28: 787-792.
- Reinman S, Thornber JP. *Biochim Biophys Acta.* 1979; 547: 188-197.
- Reisinger KS, Baxter R, Block SL, Shah J, Bedell L, Dull PM. *Clin Vaccine Immunol.* . 2009; 16: 1810-1815.
- Richmond P, Marshall H, Nissen MD, Lambert S, Jones T, Gruber W, Arora A. *16th International Pathogenic Neisseria Conference* 2008, p. 270.
- Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Séraphin B. *Nat Biotechnol.* 1999; 17: 1030-1032.
- Robbins JB, Schneerson R, Anderson P, Smith DH. *JAMA.* 1996; 276: 1181-1185.
- Rosa DD, Pasqualotto AC, de Quadros M, Prezzi SH. *Braz J Infect Dis.* 2004; 8: 328-330.
- Rosenqvist E, Norheim G, Asefa A, Caugant DA, Garcia L. *Vaccinmonitor.* 2009; 18: 18.
- Sadler K, Zhang Y, Xu J, Yu Q, Tam JP. *Biopolymers.* 2008; 90: 320-329.
- Salimans MM, Bax WA, Stegeman F, van Deuren M, Bartelink AK, van Dijk H. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004; 11: 806-807.
- Sánchez S, Abel A, Arenas J, Criado MT, Ferreirós CM. *Res Microbiol.* 2006; 157: 136-142.

- Sánchez S, Abel A, Marzoa J, Gorringer A, Criado T, Ferreirós CM. *Vaccine*. 2009; 27: 5338-5343.
- Sánchez S, Arenas J, Abel A, Criado MT, Ferreirós CM. *J Proteome Res*. 2005; 4: 91-95.
- Sarantis H, Gray-Owen SD. *Cell Microbiol*. 2007; 9: 2167-2180.
- Schägger H, Cramer WA, von Jagow G. *Anal Biochem*. 1994; 217: 220-230.
- Schägger H, von Jagow G. *Anal. Biochem*. 1991; 199: 223-231.
- Schlesinger M, Greenberg R, Levy J, Kayhty H, Levy R. *J Infect Dis*. 1994; 170: 449-453.
- Schmitt C, Villwock A, Kurzai O. *Int J Med Microbiol*. 2009; 299: 9-20.
- Scholten RJ, Kuipers B, Valkenburg HA, Dankert J, Zollinger WD, Poolman JT. *J Med Microbiol*. 1994; 41: 236-243.
- Schryvers AB, Bonnah R, Yu RH, Wong H, Retzer M. *Adv Exp Med Biol*. 1998; 443: 123-133.
- Seelert H, Krause F. *Electrophoresis*. 2008; 29: 2617-2636.
- Serruto D, Giuliane M, Comanducci M, Aricó B, Savino S, Rappuoli R, Pizza M. 2nd International workshop on *Neisseria vaccines*, p:12.
- Serruto D, Serino L, Masignani V, Pizza M. *Vaccine*. 2009; 27: 3245-3250.
- Sheng M, Hoogenraad CC. *Annu Rev Biochem*. 2007; 76: 823-847.
- Sierra GV, Campa HC, Varcacel NM, Garcia IL, Izquierdo PL, Sotolongo PF, Casanueva GV, Rico CO, Rodriguez CR, Terry MH. *NIPH Ann*. 1991; 14: 195-210.
- Smith PK, Krohm RI, Hermason GT, Mallia AK, Gartner FM, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. *Anal. Biochem*. 1985; 150: 76-85.
- Snape MD, Dawson T, Morant A, John T, Ohene-Kena B, Borrow R, Oster P, Pollard AJ. *16th International Pathogenic Neisseria Conference* 2008; p: 85.
- Speers AE, Wu CC. *Chem Rev*. 2007; 107: 3687-3714.
- Sprinzak E, Sattath S, Margalit H. *J Mol Biol*. 2003; 11: 919-923.
- Sprong T, Roos D, Weemaes C, Neeleman C, Geesing CL, Mollnes TE, van Deuren M. *Blood*. 2006; 107: 4865-4870.
- Srikhanta YN, Dowideit SJ, Edwards JL, Falsetta ML, Wu HJ, Harrison OB, Fox KL, Seib KL, Maguire TL, Wang AH, Maiden MC, Grimmond SM, Apicella MA, Jennings MP. *PLoS Pathog*. 2009; 5: e1000400.

- Stephens DS. *FEMS Microbiol Rev.* 2007; 31: 3-14.
- Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. *Lancet.* 2007; 369: 2196-2210.
- Stephens DS, Hofman LH, McGee ZA. *J. Infect. Dis.* 1983; 148: 369-376.
- Stojiljkovic I, Hwa V, de Saint Martin L, O'Gaora P, Nassif X, Heffron F, So M. *Mol. Microbiol.* 1995; 15: 531-541.
- Swatley JS, Marfin AA, Edupugantu S, Liu LJ, Cieslak P, Perkins B, Wenger JD, Stephens DS. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 271-276.
- Taha MK, Achtman M, Alonso JM, Greenwood B, Ramsay M, Fox A, Gray S, Kaczmarek E. *Lancet.* 2000; 356: 2159.
- Taha MK, Deghmane AE. En: Ferreirós CM, Criado MT, Vázquez J. (Eds). *Emerging Strategies In The Fight Against Meningitis: Molecular and Cellular Aspects.* 2002; Reino Unido: Horizon Scientific Press, Wymondham.
- Taha MK, Morand PC, Pereira Y, Eugène E, Giorgini D, Larribe M, Nassif X. *Mol Microbiol.* 1998; 28: 1153-1163.
- Taha MK, Zarantonelli ML, Alonso JM, Naess LM, Holst J, Feiring B, Rosenqvist E. *Vaccine.* 2007; 25: 2537-2538.
- Tettelin H, Saunders NJ, Heidelberg J, Jeffries AC, Nelson KE, Eisen JA, Ketchum KA, Hood DW, Peden JF, Dodson RJ, Nelson WC, Gwinn ML, DeBoy R, Peterson JD, Hickey EK, Haft DH, Salzberg SL, White O, Fleischmann RD, Dougherty BA, Mason T, Ciecko A, Parksey DS, Blair E, Cittone H, Clark EB, Cotton MD, Utterback TR, Khouri H, Qin H, Vamathevan J, Gill J, Scarlato V, Maignani V, Pizza M, Grandi G, Sun L, Smith HO, Fraser CM, Moxon ER, Rappuoli R, Venter JC. *Science.* 2000; 287: 1809-1815.
- Tomassen J, Vermeij P, Struyvé M, Benz R, Poolman JT. *Infect Immun.* 1990; 58: 1355-1359.
- Troncoso G, Sánchez S, Moreda M, Criado MT, Ferreirós CM. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000; 27: 103-109.
- Trotter C, Borrow R, Andrews N, Miller E. *Vaccine.* 2003; 21: 1094-1098.
- Trotter C, Findlow J, Balmer P, Holland A, Barchha R, Hamer N, Andrews N, Miller E, Borrow R. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14: 863-868.
- Tsai CM, Frasch CE, Mocca LF. *J Bacteriol.* 1981; 146: 69-78.
- Tsai CM. *Adv Exp Med Biol.* 2001; 491: 525-542.
- Tzitzilonis C, Prince SM, Collins RF, Achtman M, Feavers IM, Maiden MC, Derrick JP. *Proteins.* 2006; 62: 947-955.
- Uli L, Castellanos-Serra L, Betancourt L, Domínguez F, Barberá R, Sotolongo F, Guillén G, Pajón FR.

- Proteomics* 2006; 6: 3389-3399.
- Underwood EA.** *Br Med J.* 1940; i: 757-763.
- Unkmeir A, Kämmerer U, Stade A, Hübner C, Haller S, Kolb-Mäurer A, Frosch M, Dietrich G.** *Infect Immun.* 2002; 70: 2454-2462.
- van den Dobbelaen G, van Dijken H, Hamstra HJ, Ummels R, Van Alphen L.** *14th International Pathogenic Neisseria Conference* (2004), p. 153.
- van den Dobbelaen GP, van Dijken HH, Pillai S, van Alphen L.** *Vaccine.* 2007; 25: 2491-2496.
- van den Dobbelaen GP.** 2nd International Workshop on Neisserial Vaccines; 2009. 18: 18.
- van der Ende A, Hopman CT, Dankert J.** *Infect Immun* 2000; 68: 6685-6690.
- van der Ley P, van der Biezen J, Poolman JT.** *Vaccine.* 1995; 13: 401-407.
- van Deuren M, Brandtzaeg P, van der Meer JW.** *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13: 144-166.
- Vermont CL, Van Dijken HH, De Groot R, Van Alphen L, Van Den Dobbelaen GP.** *Vaccine.* 2004; 22: 3008-3013.
- Vipond C, Suker J, Jones C, Tang C, Feavers IM, Wheeler JX.** *Proteomics.* 2006; 6: 3400-3413.
- Vipond C, Wheeler JX, Jones C, Feavers IM, Suker J.** *Hum Vaccin.* 2005; 1: 80-84.
- Virji M.** *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7: 274-286.
- Volokhina EB, Beckers F, Tommassen J, Bos MP.** *J Bacteriol.* 2009; 191: 7074-7085.
- von Mering C, Krause R, Snel B, Cornell M, Oliver SG, Fields S, Bork P.** *Nature.* 2002; 417: 399-403.
- Wagner C, Khan AS, Kamphausen T, Schmausser B, Unal C, Lorenz U, Fischer G, Hacker J, Steinert M.** *Cell Microbiol.* 2007; 9: 450-462.
- Weiss MS, Schulz GE.** *J Mol Biol.* 1992; 227: 493-509.
- Welsch JA, Moe GR, Rossi R, Adu-Bobie J, Rappuoli R, Granoff DM.** *J Infect Dis.* 2003; 188: 1730-1740.
- Welsch JA, Rossi R, Comanducci M. Granoff DM.** *J Immunol.* 2004; 172: 5606-5615.
- Weynants V, Denoël P, Devos N, Janssens D, Feron C, Goraj K, Momin P, Monnom D, Tans C, Vandercammen A, Wauters F, Poolman JT.** *Infect Immun.* 2009; 77: 2084-2093.
- Weynants VE, Feron CM, Goraj KK, Bos MP, Denoël PA, Verlant VG, Tommassen J, Peak IR, Judd RC, Jennings MP, Poolman JT.** *Infect Immun.* 2007; 75: 5434-5442.

- Wiertz EJ, Delvig A, Donders EM, Brugghe HF, van Unen LM, Timmermans HA, Achtman M, Hoogerhout P, Poolman JT. *Infect Immun*. 1996; 64: 298-304.
- Williams JN, Skipp PJ, Humphries HE, Christodoulides M, O'Connor CD, Heckels JE. *Infect Immun*. 2007; 75: 1364-1372.
- Wintermeyer E, Ludwig B, Steinert M, Schmidt B, Fischer G, Hacker J. *Infect Immun*. 1995; 63: 4576.
- Wittig I, Karas M, Schägger H. *Mol. Cel. Proteomics*. 2007; 6: 1215-1225.
- Wittig I, Schägger H. *Proteomics*. 2009; 9: 5214-5223.
- Wong SH, Lennon DR, Jackson CM, Stewart JM, Reid S, Ypma E, O'Hallahan JM, Oster P, Mulholland K, Martin DR. *Pediatr Infect Dis J*. 2009; 28: 385-390.
- World Health Organization. World Health Organization technical report series, no. 594. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1976.
- Wright JC, Williams JN, Christodoulides M, Heckels JE. *Infect Immun*. 2002; 70: 4028-4034.
- Wu T, Malinverni J, Ruiz N, Kim S, Silhavy TJ, Kahne D. *Cell*. 2005; 121: 235-45.
- Yero D, Pajón R, Pérez Y, Fariñas M, Cobas K, Díaz D, Solıs RL, Acosta A, Brookes C, Taylor S, Gorringe A. *Vaccine*. 2007; 25: 5175-5188.
- Yokoyama R, Iwafune Y, Kawasaki H, Hirano H. *Anal Biochem*. 2009; 387: 60-63.
- Zolliner WD, Brant BL, Tramont EC, Dobek AS. En: Rese NR, Friedman H (Eds). *Manual of Clinical Immunology*. Washington DC: American Society for Microbiology. p. 446-453.
- Zollinger WD, Donets M, Brandt BL, Ionin B, Moran EE, Schmiel D, Pinto, Fisseha M, Labrie, Marques R, Keiser P. 16th International Pathogenic Neisseria Conference 2008; p: 51.
- <<http://neisseria.org/perl/agdbnet/agdbnet.pl?file=fetavr.xml>>
- <http://neisseria.org/perl/agdbnet/agdbnet.pl?file=nm_fhbp.xml>
- <<http://neisseria.org/perl/agdbnet/agdbnet.pl?file=poravr.xml>>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=16393>

Referencias de las tablas de vacunas (tablas 1 y 4):

- I **Ostergaard L, Lebacqz E, Poolman J, Maechler G, Boutriau D.** Immunogenicity, reactogenicity and persistence of meningococcal A, C, W-135 and Y-tetanus toxoid candidate conjugate (MenACWY-TT) vaccine formulations in adolescents aged 15-25 years. *Vaccine*. 2009; 27: 161-168.
- II **Jackson LA, Baxter R, Reisinger K, Karsten A, Shah J et al.** Phase III comparison of an investigational quadrivalent meningococcal conjugate vaccine with the licensed meningococcal ACWY conjugate vaccine in adolescents. *Clin Infect Dis*. 2009; 49: 1-10.
- III **Hodgson A, Forgor AA, Chandramohan D, Reed Z, Binka F et al.** A phase II, randomized study on an investigational DTPw-HBV/Hib-MenAC conjugate vaccine administered to infants in Northern Ghana. *PLoS One*. 2008; 3: (e)2159.
- IV **Marc LaForce F, Ravenscroft N, Djingarey M, Viviani S.** Epidemic meningitis due to Group A *Neisseria meningitidis* in the African meningitis belt: a persistent problem with an imminent solution. *Vaccine*. 2009; 27: 13-19.
- V **Martins MS, Périssé ARS, Camacho LAB, Santos TM, Silveira IAFB et al.** Phase I safety and immunogenicity study of a serogroup C conjugate vaccine- lessons learned. *Vaccinmonitor*, 2009; 18: 41.
- VI **Rosenqvist E, Norheim G, Asefa A, Caugant DA, Garcia L.** A broadly protective OMV vaccine against meningococcal disease for the african meningitis belt. *Vaccinmonitor*. 2009; 18: 18.
- VII **Norheim G, Aase A, Caugant DA, Høiby EA, Fritzsonn E et al.** Development and characterisation of outer membrane vesicle vaccines against serogroup A *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*. 2005; 23: 3762-3774.
- VIII **Sierra GV, Campa HC, Varcacel NM, Garcia IL, Izquierdo PL et al.** Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann*. 1991; 14: 195-210.
- IX **Bjune G, Høiby EA, Grønnesby JK, Arnesen O, Fredriksen JH et al.** Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet*. 1991; 338: 1093-1096.
- X **Wong SH, Lennon DR, Jackson CM, Stewart JM, Reid S et al.** Immunogenicity and tolerability in infants of a New Zealand epidemic strain meningococcal B outer membrane vesicle vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2009; 28: 385-390.
- XI **Boutriau D, Poolman J, Borrow R, Findlow J, Domingo JD et al.** Immunogenicity and safety of three doses of a bivalent (B:4:p1.19,15 and B:4:p1.7-2,4) meningococcal outer membrane vesicle vaccine in healthy adolescents. *Clin Vaccine Immunol*. 2007; 14: 65-73.
- XII **Jessouroun E, da Silveira IF, Larangeira AP, Pereira S, Fernandes SA et al.** Outer membrane vesicles (OMVs) and detoxified lipooligosaccharide (dLOS) obtained from Brazilian prevalent *N. meningitidis* serogroup B strains protect mice against homologous and

- heterologous meningococcal infection and septic shock. *Vaccine*. 2004; 22: 2617-2625.
- XIII **Menezes M, Périssé ARS, Camacho LAB, Santos TM, Silveira IAFB et al.** Phase I safety and immunogenicity study of brazilian bivalent serogroup B vaccine. *Vaccinmonitor*. 2009; 18: 40.
- XIV **Vermont CL, Van Dijken HH, De Groot R, Van Alphen L, Van Den Dobbelsteen GP.** PorA-specific differences in antibody avidity after vaccination with a hexavalent Men B outer membrane vesicle vaccine in toddlers and school children. *Vaccine*. 2004; 22: 3008-3013.
- XV **de Kleijn ED, de Groot R, Labadie J, Lafeber AB, van den Dobbelsteen G et al.** Immunogenicity and safety of a hexavalent meningococcal outer-membrane-vesicle vaccine in children of 2-3 and 7-8 years of age. *Vaccine*. 2000; 18: 1456-1466.
- XVI **van den Dobbelsteen G, van Dijken H, Hamstra HJ, Ummels R, Van Alphen L et al.** From HexaMen to NonaMen: expanding a multivalent PorA-based meningococcal outer membrane vesicle vaccine. *14th International Pathogenic Neisseria Conference* (2004), p. 153.
- XVII **Van den Dobbelsteen G.** NonaMen, a multivalent MenB OMV vaccine, from development to clinical studies. *Vaccinmonitor*. 2009; 18: 18.
- XVIII **Gorringe AR, Taylor S, Brookes C, Matheson M, Finney M et al.** Phase I safety and immunogenicity study of a candidate meningococcal disease vaccine based on *Neisseria lactamica* outer membrane vesicles. *Clin Vaccine Immunol*. 2009; 16: 1113-1120.
- XIX **Keiser PB, Moran EE, Schmiel DH, Pinto CB, Coster TS et al.** A phase I study of the safety and immunogenicity of an intramuscular group B meningococcal NOMV vaccine made from an lpxL2 and synX deleted strain. *16th International Pathogenic Neisseria Conference* 2008, p: 273.
- XX **Weynants V, Denoël P, Devos N, Janssens D, Feron C et al.** Genetically modified L3,7 and L2 lipooligosaccharides from *Neisseria meningitidis* serogroup B confer a broad cross-bactericidal response. *Infect Immun*. 2009; 77: 2084-2093.
- XXI **Snape MD, Dawson T, Morant A, John T, Ohene-Kena B et al.** Immunogenicity and reactogenicity of a novel serogroup B *Neisseria meningitidis* vaccine administered from 6 months of age. *16th International Pathogenic Neisseria Conference* 2008; p: 85.
- XXII **Oster P, Borrow R, Findlow J, Holland A, Telford K et al.** Applied reverse vaccinology: Investigational meningococcal serogroup B vaccine for infants. *Vaccinmonitor*. 2009; 18: 22.
- XXIII **Richmond P, Marshall H, Nissen MD, Lambert S, Jones T et al.** A randomized, observer-blinded, active control, phase 1 trial of meningococcal serogroup B rLP2086 vaccine in healthy children and adolescents aged 8 to 14 years. *16th International Pathogenic Neisseria Conference* 2008, p. 270.
- XXIV **Marshall H, Nissen MD, Richmond P, Lambert S, Robertson DM et al.** A randomized, placebo-controlled, double-blind, phase 1 trial of ascending doses of meningococcal group B rLP2086 vaccine in healthy adults. *16th International Pathogenic Neisseria Conference* 2008, p. 271.
- XXV **Halperin SA, Langley JM, Smith B, Wunderli P, Kaufman L et al.** Phase 1 first-in-human studies of the reactogenicity and immunogenicity of a recombinant meningococcal NspA

vaccine in healthy adults. *Vaccine*. 2007; 25: 450-457.